

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E
FARMACEUTICHE



Dipartimento di Scienze della Salute

*Corso di Dottorato di Ricerca in Metodologie innovative applicate
a malattie trasmissibili e cronico-degenerative: epidemiologia,
statistica, prevenzione, management e nursing.*

*Curriculum: Prevenzione del cancro e delle malattie cronico-
degenerative e biostatistica*

**PREVENZIONE DELLA RESISTENZA A FARMACI
CHEMIOTERAPICI: IL GLIOBLASTOMA COME
PARADIGMA**

XXXI CICLO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Alberto Izzotti

Dottoranda:

Dott.ssa Barbara Banelli

PREVENZIONE DELLA RESISTENZA A FARMACI CHEMIOTERAPICI: IL GLIOBLASTOMA COME PARADIGMA	1
Introduzione	3
Il glioblastoma multiforme: caratteristiche generali.....	3
Epidemiologia del glioma.....	4
Incidenza.....	4
Fattori di rischio e prevenzione.....	4
Trattamento del glioblastoma	5
Le istone–demetilasi e il ruolo nell’acquisizione della chemioresistenza	6
Risultati preliminari.....	7
Riassunto della tesi.....	7
Scopo della tesi	8
Materiali e metodi	9
Linee cellulari e colture primarie di GBM	9
Modello di chemioresistenza	9
Trattamenti farmacologici con TMZ e inibitori delle demetilasi istoniche	10
Saggi funzionali.....	11
Analisi della vitalità cellulare	11
Analisi dell’apoptosi.....	12
Analisi del ciclo cellulare	13
Analisi dell’autofagia	13
Analisi di proliferazione cellulare.....	14
Analisi dell’attivazione di PI3K	15
Test di clonogenicità.....	15
Analisi di espressione in Real Time RT-PCR semiquantitativa	16
Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).....	18
Modello animale	19
Farmacocinetica di JIB 04	20
Risultati	23
JIB 04, CPI-455 e GSK J4 inibiscono preferenzialmente la proliferazione delle cellule GBM resistenti alla TMZ	23
Attività di JIB 04 su colture primarie di GBM coltivate in condizioni di staminalità e differenziamento	26
Superamento della chemioresistenza del GMB utilizzando altri inibitori delle istone–demetilasi (KDM)	28
Il trattamento con JIB 04 modula l'espressione dei geni coinvolti nel controllo della crescita delle cellule tumorali e porta all'aumento di metilazione dell'istone H3 alla lisina 4 (H3K4m3)	29
Effetti funzionali del trattamento con JIB 04 su cellule di GBM	31
JIB 04 attiva l'autofagia in cellule di GBM.....	31
JIB 04 induce apoptosi in cellule di GBM	31
JIB 04 induce l'inattivazione del pathway PI3K	33
JIB 04 è una molecola ad azione rapida che inibisce la clonogenicità.	35
JIB 04 sinergizza con TMZ inducendo citotossicità sulle cellule di GBM	38
Analisi <i>in vivo</i> dell'effetto di JIB 04.....	42
Discussione.....	48
Bibliografia.....	53
Ringraziamenti.....	61

Introduzione

Il glioblastoma multiforme: caratteristiche generali

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il più frequente tumore del Sistema Nervoso Centrale, ed è il più aggressivo tumore di derivazione astrocitaria. Il GBM è classificato come glioma di grado IV in base alla classificazione WHO ¹ e rappresenta il 54% dei gliomi e il 16% di tutti i tumori cerebrali primitivi ².

Il GBM è un tumore difficilmente trattabile, con esito invariabilmente fatale. La sopravvivenza media è di circa 15 mesi (a due anni dalla diagnosi la sopravvivenza è del 26-33%) ed è correlata alle spiccate caratteristiche recidivanti di questa neoplasia e al fatto che la resezione tumorale è spesso incompleta ^{3 4}.

La localizzazione tumorale è solitamente a carico della materia bianca subcorticale degli emisferi cerebrali; in particolare sono coinvolti i lobi temporale (31%), parietale (24%), frontale (23%) e quello occipitale (16%), spesso in combinazione fronto-temporale, con infiltrazione alla corteccia, ai gangli della base e all'emisfero contro-laterale ⁵.

Il GBM comprende i due sottotipi primario e secondario che evolvono secondo differenti pathway genetici e colpiscono gruppi di pazienti che si distinguono per età e outcome ⁶: i GBM primari rappresentano circa l'80% dei GBM e colpiscono pazienti più anziani (età media 62 anni) mentre i GBM secondari si sviluppano a partire da astrocitomi o oligodendrogliomi di basso grado e si presentano in pazienti più giovani (età media 45 anni) ^{7 8 9}.

Epidemiologia del glioma

Incidenza

Secondo il rapporto 2013 del Registro Centrale dei Tumori Cerebrali degli Stati Uniti (CBTRUS), il tasso di incidenza (IR) del GBM nella popolazione è di 3.19/100.000, il più alto tra i tumori cerebrali e del SNC con comportamento maligno¹⁰. In Italia questo tumore colpisce ogni anno circa 1.500 persone, con un picco di incidenza compreso tra 50 e 65 anni. Rispetto al genere, gli uomini presentano un maggior tasso di incidenza rispetto alle donne (3.97 vs 2.53). Le popolazioni di origine caucasica hanno un tasso di incidenza che è doppio rispetto ai ceppi africani e afro- americani mentre è minore quello riscontrato tra gli Asiatici e i nativi Americani¹¹.

Fattori di rischio e prevenzione

I fattori che sono stati associati al rischio di GBM riguardano gli eventuali trattamenti radioterapici pregressi¹², la minore suscettibilità alle allergie e fattori immunitari¹³. In particolare, studi di associazione genomica hanno evidenziato che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) correlati all'aumentato rischio di asma sono associati ad una diminuzione del rischio di GBM¹⁴. La diminuzione del rischio di sviluppare GBM è associata alle dermatiti atopiche (eczema, psoriasi) mentre l'uso a lungo termine di farmaci antistaminici è stato posto in relazione con lo sviluppo del GBM in pazienti con asma o allergia¹⁵ anche se gli studi non sono ancora conclusivi.

Non è stata dimostrata una sostanziale associazione tra il GBM e abitudini legate allo stile di vita quali il fumo di sigaretta, il consumo di alcol, l'uso di stupefacenti o l'esposizione a composti nitrosi¹⁶. Dati conflittuali o non conclusivi sono stati pubblicati riguardo l'associazione tra GBM e l'uso di telefoni cellulari^{17 18 19 20}. Nel 2011 lo IARC ha incluso i campi elettromagnetici a radiofrequenza (RF-EMF) dei telefoni cellulari o di

altre fonti che emettano campi elettromagnetici non ionizzanti simili nel Gruppo 2B come “possibili” cancerogeni per l’uomo. Per quanto riguarda le sorgenti di radiazioni non ionizzanti estremamente basse (ELF), che sono anch’esse classificate dallo IARC nel Gruppo 2B ²¹, lo studio INTEROCC ha messo in evidenza una possibile positiva associazione tra l’esposizione alle ELF nei quattro anni precedenti la diagnosi di glioma e lo sviluppo di tumore cerebrale stesso²². Sia nel caso delle RF-EMF che delle ELF, data la latenza nello sviluppo del GBM, le valutazioni a questo proposito rimangono sotto attenta osservazione ²³.

Trattamento del glioblastoma

Il Glioblastoma rappresenta un rilevante problema clinico: la mortalità è estremamente elevata (sale al 90% entro i primi due anni dalla diagnosi se trattato solo con radioterapia) e gli attuali approcci terapeutici risultano nel complesso poco efficaci per problematiche correlate alla natura stessa di questo tumore: la resezione chirurgica è spesso incompleta mentre la radioterapia, fino a pochi anni fa terapia di elezione, induce radio-resistenza²⁴. L'utilizzo della chemioterapia è stata, ed è, un fattore limitante per l'intrinseca necessità di superare la barriera ematoencefalica (BBB), problematica che si somma alla sostanziale refrattarietà ai trattamenti che mostrano i pazienti.

Nel 2005 i risultati di un trial clinico, che prevedeva l'introduzione del chemioterapico Temozolomide (TMZ) in aggiunta alla radioterapia, ha prodotto un piccolo ma significativo incremento nella sopravvivenza dei pazienti (che a due anni è passata dal 10 al 26,5%).

Attualmente, il protocollo standard di trattamento consiste in un approccio multimodale che prevede la resezione chirurgica seguita da trattamento radioterapico (RT) con concomitante trattamento chemioterapico di sei cicli con TMZ ²⁵.

Il Temozolomide è un agente alchilante e la O⁶me-G, una delle modifiche che induce sul

DNA, è importante per l'attività citotossica del TMZ stesso. L'enzima codificato dal gene O⁶-Methylguanine-DNA Methyl-transferase (MGMT) rimuove i gruppi metilici dalla O⁶me-G contrastando l'azione del TMZ ²⁶. Nel glioblastoma, MGMT risulta frequentemente silenziato da metilazione del DNA e, di conseguenza, i pazienti che presentano questa alterazione epigenetica sono più sensibili al trattamento con TMZ ²⁷.

Nonostante l'utilizzo del TMZ e l'individuazione dei pazienti più responsivi sulla base della metilazione del gene MGMT, questo trattamento chemioterapico migliora ma non risolve le criticità del glioblastoma anche per l'instaurarsi della chemioresistenza che diventa potenzialmente fatale visto il rapido decorso della malattia e la mancanza di farmaci alternativi.

Le istone–demetilasi e il ruolo nell'acquisizione della chemioresistenza

Per lo studio oggetto di questa tesi ci siamo avvalsi di un modello di chemioresistenza che si è dimostrato applicabile su diverse tipologie tumorali e che ha sostanzialmente attribuito i meccanismi di chemioresistenza acquisiti in seguito ai trattamenti chemioterapici ad un ristretto numero di cellule resistenti, non staminali, che non vengono eliminate dai trattamenti chemioterapici standard e che sono poi presumibilmente responsabili della recidiva a partire da cellule che hanno acquisito la chemioresistenza²⁸.

Nel presente studio abbiamo trasferito il modello prima descritto a linee continue e primarie di glioblastoma ²⁹ e, utilizzando alte dosi di TMZ, abbiamo selezionato le cellule che hanno acquisito la resistenza al farmaco. Tali cellule (che abbiamo chiamato TMZ-R), crescono, seppur lentamente, in presenza di alte dosi di TMZ e tornano parzialmente o anche totalmente sensibili se il trattamento viene sospeso (cellule TMZ washed-out, TMZ WO). Questo comportamento dinamico ha suggerito la presenza di una alterazione di tipo epigenetico correlata all'acquisizione della chemioresistenza e la letteratura

scientifica ha indirizzato lo studio verso una classe di modificatori della cromatina: le demetilasi delle lisine degli istoni (KDMs).

Risultati preliminari

Da uno studio svolto *in silico* su 530 pazienti con glioblastoma, i cui dati sono disponibili sul database TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>), abbiamo osservato aumentati livelli di espressione, rispetto allo stesso tessuto non tumorale, di alcune demetilasi istoniche (KDM) tra cui KDM1A, KDM5B, KDM4A, KDM4B, KDM6B e in particolare KDM5A. Nel nostro modello abbiamo osservato che, nella frazione di cellule resistenti al TMZ, l'espressione di KDM5A aumentava rispetto alle cellule di partenza per poi diminuire in seguito alla sospensione del trattamento; nelle stesse cellule abbiamo verificato un'aumentata resistenza all'apoptosi e un parziale blocco in G2 tipico del trattamento con TMZ. Tale blocco però non sembra sufficiente a bloccare tutte le cellule, una frazione delle quali presumibilmente è in grado di riprendere il ciclo cellulare contribuendo alla resistenza al TMZ. Abbiamo effettuato esperimenti di trasfezioni per introdurre KDM5A nelle cellule non resistenti inducendo un fenotipo simile alle cellule resistenti del nostro modello. Al contrario abbiamo silenziato KDM5A nelle cellule resistenti e le abbiamo rese nuovamente sensibili al TMZ dimostrando la centralità della demetilasi istonica KDM5A in questi processi³⁰.

Riassunto della tesi

Abbiamo determinato l'effetto di JIB 04 e CPI-455, due inibitori delle KDM, su cellule di glioblastoma (GBM) e abbiamo scoperto che entrambe le molecole sono più efficaci contro le cellule TMZ-resistenti rispetto a quelle native.

JIB 04 in particolare ha come target principale KDM5A, attiva vie autofagiche e apoptotiche, interferisce con la progressione del ciclo cellulare, inibisce la clonogenicità e la defosforilazione delle cellule Akt, inattivando nel complesso una potente via pro-

sopravvivenza delle cellule tumorali. I trattamenti *in vitro* combinando Temozolomide e JIB 04 hanno dimostrato che queste due molecole, in determinate condizioni, hanno un forte effetto sinergico e abbiamo ipotizzato che JIB 04 intercetti le cellule che sfuggono al blocco del ciclo cellulare in G2 esercitato da TMZ. Infine abbiamo studiato la permeabilità di JIB 04 attraverso la barriera emato-encefalica e abbiamo scoperto che questa molecola raggiunge una concentrazione bioattiva nel cervello; inoltre un esperimento pilota *in vivo* in un modello di xenotrapianto ortotopico di GBM ha indicato un trend verso una maggiore sopravvivenza nei topi (HR=0,5).

La combinazione tra farmaci citotossici e molecole che agiscono sull'epigenoma potrebbero offrire l'opportunità sviluppare nuove terapie per questa malattia invariabilmente letale.

Scopo della tesi

Questo progetto si prefigge di chiarire alcuni meccanismi di resistenza intrinseci o acquisiti in seguito a chemioterapia con TMZ e di identificare molecole in grado di superare o prevenire l'acquisizione della resistenza.

Studiare meccanismi che mantengano o che ripristinino la chemiosensibilità al trattamento è una necessità clinica prioritaria nella gestione del glioblastoma.

Il progetto, che si articola nell'ambito della prevenzione oncologica terziaria ³¹ si prefigge, tramite un piano di sperimentazione *in vivo* e *in vitro*, di porre le basi almeno teoriche per prevenire le eventuali recidive di glioblastoma che insorgono dopo i trattamenti chirurgici e radio-chemio-terapici, valutando la possibilità di introdurre nella pratica clinica terapie adiuvanti che permettano un maggiore controllo della chemioresistenza al TMZ, chemioterapico di elezione nel GBM, contribuendo a prolungare gli intervalli liberi da malattia e aumentando la sopravvivenza di questi pazienti.

Materiali e metodi

Linee cellulari e colture primarie di GBM

Le linee cellulari di GBM umano A172, U251, CAS1, DBTRG e U87 (acquistate dalla Banca Cellule dell'Ospedale Policlinico San Martino, Genova; www.iclc.it) sono state coltivate in terreno DMEM addizionato con 10% FBS e 2mM L-Glutammina. L'autenticità delle linee è stata certificata dalla stessa Banca Cellule analizzando 8 loci STR altamente polimorfici e il gene amilogenina (Cell IDTM, Promega).

Le colture cellulari arricchite in cellule staminali tumorali di GBM umano (CSCs- GBM3 e GBM23), sono state ottenute da culture primarie di GBM cresciute in condizione di staminalità in mezzo privo di siero, contenente bFGF e EGF ³².

Modello di chemioresistenza

La resistenza al Temozolomide è stata ottenuta esponendo le colture cellulari ad un trattamento acuto con il farmaco. Questa modalità ha consentito di non indurre un fenotipo resistente ma di selezionare cellule resistenti nella popolazione wild type. Il terreno di trattamento è stato cambiato ogni 48 ore fino alla comparsa di cloni cellulari TMZ-resistenti (TMZ-R), che si sono sviluppati, a seconda delle linee, entro circa 30 giorni dall'inizio del trattamento. Per la selezione sono state utilizzate concentrazioni di TMZ da 100mM a 600mM a seconda del livello di resistenza basale intrinseca delle cellule. Le cellule TMZ-R (Figura 1), alle quali è stato sospeso il trattamento per circa 30 giorni (periodo di Drug Holiday) sono risultate essere nuovamente o parzialmente sensibili al TMZ e costituiscono una terza tipologia cellulare che abbiamo chiamato TMZ WO (TMZ Washed Out).

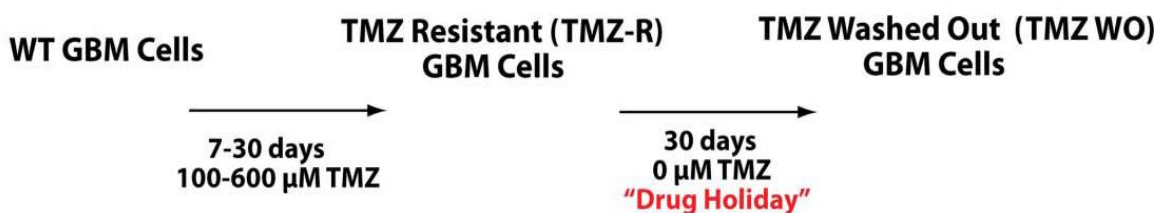


Figura 1: modello di acquisizione della chemio resistenza al TMZ ²⁶

Il monitoraggio dell'acquisizione della chemioresistenza è stato condotto in tutti gli esperimenti effettuati, tramite saggi *in vitro* di valutazione dell'acquisizione della resistenza all'apoptosi e del parziale superamento del blocco nella fase G2/M del ciclo cellulare (l'induzione dell'apoptosi e del blocco in G2/M sono noti effetti funzionali del TMZ).

Trattamenti farmacologici con TMZ e inibitori delle demetilasi istoniche

Il Temozolomide (TMZ) è stato acquistato da Sigma- Aldrich (Milano, Italy), la molecola JIB 04 da Tocris (Bristol, UK) e Selleckchem (Munich, Germany), CPI 455 da Axon Medchem (Groningen, NL) e GSK J4 da Cayman Chemicals (Michigan, USA). TMZ e CPI 455 sono stati diluiti in DMSO alla concentrazione finale di 100 mM, JIB 04 e GSK J4 in DMSO alla concentrazione di 10 mM (Tabella 1).

L'interazione tra TMZ e JIB 04 è stata valutata testando l'attività di TMZ e JIB 04 combinati insieme in un rapporto costante. L'indice di combinazione (C.I.) che esprime quantitativamente l'interazione farmacologica, è stato calcolato secondo le equazioni di Chou-Talalay utilizzando il software CompuSyn (www.combosyn.com).

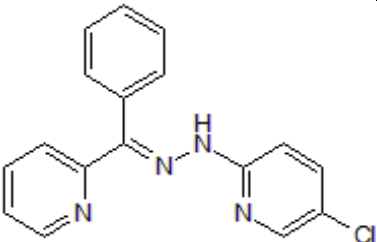
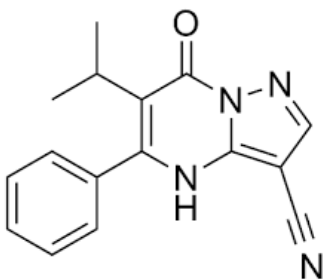
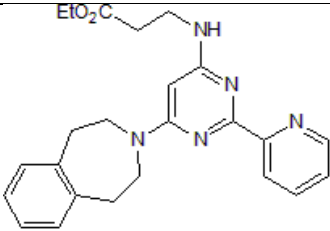
Nome dell'inibitore delle KDM	Struttura chimica dell'inibitore KDM	KDM inibita
JIB 04		KDM5A KDM4D KDM4B KDM4A KDM4C
CPI-455		KDM5A KDM5B KDM5C KDM5D
GSK J4		KDM6B

Tabella 1: Inibitori delle demetilasi istoniche utilizzate nello studio e loro principali target di inibizione

Saggi funzionali

Analisi della vitalità cellulare

Per l'analisi della vitalità cellulare è stato utilizzato il citofluorimetro Muse Cell Analyzer (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy), mediante l'apposito reagente dedicato "Muse Count and Viability" (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy). Il principio dell'analisi è quello di colorare in modo differenziale le cellule vitali e quelle non vitali sulla base della loro diversa permeabilità a due coloranti. Uno dei due coloranti discrimina tra cellule vitali

(che non permettono al colorante di penetrare nella cellula avendo queste la membrana integra) e quelle non vitali (morte o in procinto di morire che, invece, si colorano) determinando il parametro di vitalità. Un secondo colorante permeabile alla membrana plasmatica colora tutte le cellule nucleate distinguendole da quelle non nucleate e dai detriti cellulari. Brevemente, 20 µl di sospensione cellulare (concentrazione compresa tra 10^5 e 10^7 cellule/ml), vengono diluiti 1:20 con il reagente contenente i due coloranti e incubati al buio a temperatura ambiente per 5 minuti. Il citofluorimetro Muse grazie al software " Muse™ Count & Viability Software Module" conta poi le cellule nucleate e colorate e valuta la dimensione cellulare come parametro per distinguere le cellule dai nuclei liberi e dai detriti cellulari determinando il conteggio cellulare totale, delle cellule vitali e della percentuale di vitalità del campione.

Analisi dell'apoptosi

Per la valutazione dell'apoptosi è stato utilizzato il citofluorimetro Muse Cell Analyzer (Millipore), mediante il saggio dedicato "Annexin V & Dead Cell" (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy). Il principio del saggio si basa sui cambiamenti morfologici che avvengono durante il processo apoptotico. L'Annessina V è una proteina che ha alta affinità per la fosfatidilserina (PS), che è un componente del lato interno della membrana cellulare. Durante le prime fasi del processo apoptotico le PS vengono esternalizzate e quindi legate dalla Annessina V utilizzata nel saggio. In combinazione con Annessina V, il 7-AAD, un marcatore di morte cellulare che non riesce a colorare le cellule vitali o quelle in fase precoce di apoptosi, è utilizzato come indicatore dell'integrità delle membrane cellulari. La positività ad almeno uno, entrambi o a nessuno dei due marcatori distingue tra cellule necrotiche, non apoptotiche, in apoptosi precoce o tardiva.

A 100 µl di una sospensione cellulare (concentrazione compresa tra 10^4 e 5×10^5 cellule/ml) si aggiungono 100 µl del reagente del saggio "Annexin V & Dead Cell" contenente

Annessina V e 7-AAD. Dopo un'incubazione a temperatura ambiente di 20 minuti i campioni vengono analizzati al Muse tramite lo specifico programma per la valutazione dell'apoptosi.

Analisi del ciclo cellulare

Le fasi del ciclo cellulare sono state valutate con il Muse Cell Analyzer (Millipore) mediante il Muse Cell Cycle kit (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy). Il saggio prevede l'utilizzo dello Ioduro di propidio (IP), un intercalante fluorescente del DNA, che discrimina le cellule in base al loro contenuto di DNA: le cellule in fase S del ciclo cellulare raddoppiano il loro DNA per cui nella fase G₂/M il contenuto di DNA sarà doppio rispetto a quello delle cellule "resting" (G₀/G₁). Sulla base dell'intensità della fluorescenza data dallo IP per ogni cellula si determina il numero di cellule nelle varie fasi del ciclo. Il metodo prevede che per ogni campione, 10⁶ cellule di una sospensione cellulare il più possibile monodispersa, vengano centrifugate alla velocità di 300g per 5 minuti, cui seguono due lavaggi di 5 min in PBS alla stessa velocità. Il pellet cellulare ottenuto viene fissato risospingendolo in 1 ml di Etanolo 70%. Dopo almeno 3 ore a -20°C le cellule vengono centrifugate e risospese in PBS e centrifugate a 300g per 5 minuti. Rimosso tutto il supernatante, le cellule vengono risospese in 200 µl di Muse Cell Cycle Reagent che contiene IP. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e in assenza di luce il campione viene analizzato al Muse Cell Analyzer (Millipore).

Analisi dell'autofagia

L'analisi dell'autofagia è stata effettuata tramite analisi citofluorimetrica utilizzando l'anticorpo anti- LC3 coniugato con Alexa Fluor®555 tramite il Muse Cell Analyzer (Millipore). Il Kit Muse™ Autophagy LC3-antibody (Millipore-Merck, Vimodrone MI,

Italy) consente di discriminare tra LC3 citosolico, eliminandolo con una permeabilizzazione cellulare selettiva, da quello associato all'autofagosoma. Il metodo prevede l'analisi di circa 40,000 cellule per pozzetto in piastre da 96 coltivate per 24 ore in 200µl di terreno. Le cellule sono trattate per almeno 2 ore con un reagente del kit che induce autofagia in condizioni di deprivazione nutrizionale. Le cellule vengono staccate, centrifugate a 2500 rpm per 5 min e dopo un lavaggio sono risospese in un secondo buffer contenente per ogni campione 5 µL di anticorpo Anti-LC3 Alexa Fluor®555 in 95µL di tampone specifico e incubate 5 min. Dopo l'incubazione e un successivo lavaggio per eliminare l'anticorpo le cellule vengono analizzate al Muse Cell Analyzer.

Analisi di proliferazione cellulare

La determinazione della proliferazione è stata condotta con il metodo colorimetrico “One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega, Milano, Italy). Il saggio prevede l'uso di un'unica soluzione di MTS, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4- sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt], un composto di tetrazolio addizionato con fenazina etosolfato (PES), un reagente di accoppiamento elettronico che si combina chimicamente a MTS per formare una soluzione stabile. Il composto di tetrazolio MTS viene ridotto dalle cellule in un prodotto colorato (formazano) che è solubile nel mezzo di coltura. La quantità di formazano prodotta viene misurata in termini di assorbanza a 490nm ed è proporzionale al numero di cellule in coltura. Il saggio prevede l'aggiunta della soluzione di MTS (20µl) direttamente nei pozzetti di coltura contenenti 100 µl di mezzo di coltura, un'incubazione di 2 ore (in incubatore a 37°C, 5% CO₂ e condizioni di umidità controllata) e la registrazione dell'assorbanza a 490nm tramite un fotometro per micropiastre (Multiskan FC, Thermo Scientific). Per ogni condizione sperimentale sono stati

analizzati 3 replicati tecnici e calcolate media e deviazione standard. La significatività statistica è stata calcolata mediante Test t di Student.

Analisi dell'attivazione di PI3K

Il pathway PI3K/Akt costituisce un punto nodale in molti processi cellulari quali la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione cellulare.

Il sistema “PI3K Activation Dual Detection Kit” (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy), che utilizza per l’acquisizione e l’elaborazione dei dati il Muse Cell Analyzer (Millipore-Merck, Vimodrone MI, Italy), misura il livello di fosforilazione di Akt in relazione al suo livello di espressione totale tramite due anticorpi marcati: l’anticorpo anti-phospho-Akt (Ser473), Alexa Fluor®555 e un anticorpo anti-Akt, coniugato a PECy5. Per ogni campione 100,000 cellule vengono risospese in 50 µL of 1X Assay Buffer, in 50 µL di Fixation Buffer e incubate per 5 min in ghiaccio.

Dopo avere centrifugato e aver eliminato il supernatante, le cellule vengono permeabilizzate per 5 min in ghiaccio con 100 µL di “Permeabilization Buffer”.

Le cellule sono poi recuperate e risospese in 100 µL 1X Assay Buffer contenente i due anticorpi. Dopo una incubazione di 30 min in assenza di luce le cellule vengono lavate e recuperate, risospese in 200 µL di 1x Assay Buffer e lette al Muse Cell Analyzer.

Test di clonogenicità

Il test di clonogenicità consente di valutare se un determinato trattamento può ridurre la sopravvivenza clonogenica delle cellule tumorali. Le cellule da testare (circa 500,000) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti in duplicato. Nel nostro disegno sperimentale abbiamo valutato diverse concentrazioni di farmaco JIB 04 (da 60 a 1000 nM) e diverse tempistiche, da un’ora a 12 ore di trattamento. Dopo il periodo di trattamento, le cellule, lasciate in

incubatore per circa 1-3 settimane, generano dei cloni che vengono confrontati con la relativa piastra di controllo non trattata. Dopo la crescita dei cloni, le piastre vengono lavate e le cellule adese vengono fissate con una soluzione di acido acetico/metanolo 1:7 (vol/vol) per 5 min a temperatura ambiente. Dopo avere eliminato la soluzione di fissaggio dai pozzetti, le cellule sono state sottoposte in una soluzione di cristal-violetto 0.5% per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio con acqua per eliminare il cristal-violetto le piastre sono state lasciate ad asciugare. Le immagini delle piastre sono state acquisite con l'acquisitore Uvitec (Cambridge, UK) tramite il quale abbiamo contano le colonie. Il conteggio delle colonie consente di valutare l'efficienza di attecchimento delle cellule non trattate nei pozzetti di controllo (PE) e la frazione di cellule sopravvissute al trattamento (SF) secondo queste elaborazioni:

$PE = \text{n. colonie nel controllo non trattato} / \text{n. cellule seminate} \times 100\%$

$SF = \text{n. colonie nel trattato} / \text{n. cellule seminate} \times PE$

Analisi di espressione in Real Time RT-PCR semiquantitativa

Per l'analisi dell'espressione genica abbiamo estratto l'RNA totale (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Milano, Italy) e 1µg di RNA è stato retrotrascritto con il QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Milano, Italy).

Ogni campione è stato analizzato in triplicato amplificando 25ng di cDNA con l'enzima Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, St Leon-Rot, Germany) e 300nM di primer in un volume finale di 10µl tramite la Ep Realplex Mastercycler (Eppendorf, Milano, Italy).

Le reazioni sono state assemblate utilizzando l'Ep Motion 5070 liquid handling station (Eppendorf, Milano, Italy).

I primer utilizzati per l'analisi di espressione dei trascritti di KDM4A, KDM4B, KDM5A, KDM5B, KDM6A, KDM6B, sono stati scelti da un database pubblico (<http://medgen.ugent.be/rtpriimerdb/>), CCNB1, PCNA and DEPP dalla letteratura scientifica³³ mentre il disegno dei primer di DDIT4 è stato effettuato con il programma Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>). Per l'amplificazione è stata utilizzata una amplificazione standard in due step con annealing a 60°C. L'amplificazione relativa di ogni gene target è stata ottenuta utilizzando il metodo del Ct comparativo. I geni di riferimento (ATP5b, SDHA1 e CYC1) sono stati selezionati utilizzando il metodo statistico del GeNorm (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK). Per ogni campione i valori medi del Ct sono stati normalizzati (media geometrica) e il valore di Fold Induction è scaturito dal confronto con un campione usato come calibratore mediante il calcolo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I primer sono elencati in Tabella 2.

Espressione genica	Primer	Sequenza
KDM4A	Forward	5'-GATGAAGAGCTTCCCAAGAG -3'
	Reverse	5'-CTTCCCGGTATCTTGAGTTG -3'
KDM4B	Forward	5'- TGCTTCCACAGCTCGTA-3'
	Reverse	5'-GACATGGTCAAGATCTCCAT -3'
KDM5A	Forward	5'-AGCCGAGTTGGGAGGAGTT -3'
	Reverse	5'-TGGACTCTTGGAGTGAAACGA -3'
KDM5B	Forward	5'- GAATGCATCTGCCATTTCAC -3'
	Reverse	5'-GAGGTGTCCTAAGTGTTTGG -3'
KDM6A	Forward	5'- TAGAGGCTCAGTTGTGTAACT-3'
	Reverse	5'- CTGCGGGAATTGGTAGGCTC-3'
KDM6B	Forward	5'- CCTCGAAATCCCATCACAGT-3'
	Reverse	5'- GTGCCTGTCAGATCCCAGTT-3'
CCNB1	Forward	5'- TGTCTCCATTATTGATCGGTTCA -3'
	Reverse	5'- CCAACCAGTTGCAGCATGT -3'
DEPP	Forward	5'- TGCTCATCCATTCTCCTGC -3'
	Reverse	5'- AAGCCGGGACCTCATCACT -3'
PCNA	Forward	5'- GGCACTCAAGAACCTCATCA-3'
	Reverse	5'- GGTTACACCGCTGGAGCTA -3'
DDIT4	Forward	5'- GGTCAGTGAAGCAGCTCGAA -3'
	Reverse	5'- CCTGGACAGCAGCAACAGT -3'
ChIP	Primer	Sequenza
DEPP	Forward	5'- TGATGAGGTCCCGGCTTC -3'
	Reverse	5'- ATCTGCCCACAATTCGGGA -3'

Tabella 2 Sequenza dei primer utilizzati nell'analisi dell'espressione genica e in ChIP

Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

L'immunoprecipitazione della cromatina è stata condotta utilizzando il sistema Epitect® ChIP One Day Kit (Qiagen, Milano, Italy). Le cellule A172, non trattate e trattate per 4 ore con JIB 04 500nM, sono state sottoposte a cross-linking con 1% formaldeide per 10 min a 37°C per stabilizzare le proteine istoniche della cromatina legandole covalentemente al DNA. Dopo aver lisato le cellule, la cromatina così stabilizzata è stata frammentata tramite

sonicazione, fino ad ottenere frammenti di circa 500 bp. Una aliquota di cromatina, determinata in percentuale sul totale, è stata prelevata per essere utilizzata come Input nella reazione di Real Time PCR per le valutazioni semiquantitative. La restante cromatina è stata incubata per circa 12 ore a 4°C con l'anticorpo anti-H3K4me3 Polyclonal Antibody (Epigentek, Farmingdale NY, USA) mentre una reazione parallela è stata fatta incubare con l'anticorpo irrilevante anti alpha-GFP di pollo (Invitrogen – Thermo Fisher, Waltham, MA). Un anticorpo secondario che riconosce l'anticorpo primario anti-H3K4me3 è stato aggiunto alle reazioni di incubazione. Dopo 2 ore a 4°C l'immunoprecipitato costituito dalla cromatina legata dall'anticorpo primario anti-H3K4me3 si recupera tramite centrifugazione perché complessato a specifiche biglie. Attraverso l'inversione del processo di cross-linking (66 °C per 6 ore) il DNA viene liberato dal complesso di biglie e anticorpi, viene estratto con fenolo/cloroformio e precipitato. Il DNA immunoprecipitato è stato quantificato tramite Real Time PCR con i primer descritti in Tabella 2, specifici per la regione promotrice del gene DEPP, valutato in riferimento alla % di Input (che rappresenta il totale del DNA non immunoprecipitato) sottraendo il background costituito dalla parallela valutazione condotta sul campione immunoprecipitato con l'anticorpo irrilevante.

Modello animale

Abbiamo utilizzato come modello animale, nel quale testare la tossicità e la capacità di diffusione e metabolizzazione della molecola JIB 04 nei diversi organi, topi C57 BL6/J (8 settimane di età; Charles River Laboratories, Lecco, Italy). Ai topi sono stati iniettati per via intraperitoneale singole dosi di JIB 04 a varie concentrazioni fino ad un massimo di 110mg/kg. Considerati gli eventi collaterali osservati sul modello murino per concentrazioni di JIB 04 tra gli 80 e 110 mg/Kg, abbiamo stabilito dosi di JIB 04 di 50 e 60 mg/Kg in olio di sesamo al 90%, DMSO al 10% utilizzabile per i nostri esperimenti. Sono stati raccolti

alcuni campioni di sangue (0,1ml) dalla regione retro-orbitale a 30 minuti e a 6 ore dopo la somministrazione del farmaco. Dopo l'eutanasia, i cervelli dei topi sono stati raccolti, pesati e omogeneizzati in acqua ghiacciata (5 ml / g di tessuto).

Per valutare se JIB 04 potesse raggiungere concentrazioni clinicamente funzionali nel tessuto cerebrale, la stessa procedura è stata ripetuta su 9 topi dopo 5 giorni di dosaggio a 20, 40 e 60 mg / kg / die.

Per la valutazione dell'effetto di JIB 04 sul glioblastoma, cellule della linea cellulare DBTRG sono state inoculare endocranicamente in topi adulti NOD-SCID (età 6-8 settimane, Charles River Laboratories, Lecco, Italia)³⁴. In breve, gli animali sono stati posizionati in un apparato stereotassico e iniettati nello striato sinistro con 3 µl di sospensione cellulare, contenenti 3×10^5 cellule di DBTRG negative al trypan. Una settimana dopo l'inoculazione del tumore, i topi sono stati assegnati in modo casuale a gruppi di trattamento e controllo (5 topi / gruppo). I topi trattati hanno ricevuto 60 mg / kg 3 volte alla settimana per 3 settimane. I topi sono stati monitorati quotidianamente e sacrificati all'inizio dei sintomi neurologici.

Farmacocinetica di JIB 04

Lo studio è stato condotto sui campioni di tessuto estratto dal modello murino C57 BL6/J cui sono state iniettate dosi di JIB 04 ai fini di valutare tossicità e biodisponibilità. A 45 µl di omogenato di tessuto sono stati aggiunti 205 µl di acetonitrile. I campioni sono stati vortexati per 30 secondi, incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e quindi centrifugati per 15 minuti. Al termine, 200 µl di surnatante sono stati raccolti, liofilizzati e conservati a -20°C fino al momento dell'uso (la stessa procedura è stata applicata anche per l'analisi dei campioni di plasma). Dall'omogenato del tessuto cerebrale è stata preparata una curva di calibrazione per JIB 04 con le seguenti concentrazioni di farmaco: 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 µM. Ogni punto è stato analizzato in duplicato. Il contenuto di JIB 04 è stato

determinato mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC) / spettrometria di massa (MS).

La separazione è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC costituito da un degasatore sottovuoto, un autocampionatore, una pompa capillare e un comparto colonne termostato (Agilent serie 1200, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). In breve, i campioni liofilizzati sono stati ricostituiti con 60 µl di acetonitrile e sonicati per 5 minuti, quindi sono stati aggiunti 40 µl di acqua in ciascuna provetta e i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti.

Due microlitri di campione sono stati iniettati su una colonna ZORBAX SB-C18 da 0,5 mm × 250 mm, dimensione 5 micron (Agilent Technologies). Le fasi mobili A erano formate di ammonio 20 mM in acido acetonitrile-acqua-formico (60: 40: 0,1); la fase mobile B in isopropanolo-acetonitrile (80:20). La velocità di flusso era di 20 µl / min e l'eluizione è stata eseguita in questa sequenza: isocratico 100% A per 10 minuti, un gradiente lineare nel corso di tre minuti a 100% B, 100% B per 25 minuti e infine un gradiente lineare al 100% A di tre minuti. Il tempo di riequilibrio in 100% A è stato di 25 minuti. Sebbene l'eluizione del JIB 04 sia avvenuta durante la prima fase isocratica, è stata necessaria una forte fase di lavaggio idrofobica per assicurare la completa eluizione delle molecole altamente lipofile contenute nei tessuti cerebrali.

Il flusso di eluizione è stato inviato direttamente alla sorgente di ioni elettrospray (ESI) dello 6230B TOF LC/MS (tecnologia Agilent) per caratterizzare i picchi HPLC. Sono stati applicati i seguenti parametri operativi: tensione capillare: 3000 V; pressione del nebulizzatore: 20 psig; gas di essiccazione: 5 L / min; temperatura del gas: 300 ° C; tensione del frammentatore: 200 V; tensione dello skimmer: 60 V; ottapolo RF: 250 V. I dati di scansione completa, registrati utilizzando il software Mass Hunter di Agilent, sono stati elaborati con Mass Hunter Qualitative Analysis (tecnologia Agilent). Spettri di massa, che vanno da 100-1000 m / z, sono stati acquisiti in modalità ioni positivi di reflectron e la

quantità relativa di JIB-04 è stata misurata dall'area di picco di corrente di ioni estratti (EIC)
(m/z 309,09 [M + H]⁺).

Risultati

JIB 04, CPI-455 e GSK J4 inibiscono preferenzialmente la proliferazione delle cellule

GBM resistenti alla TMZ

Mediante MTS, abbiamo valutato la sensibilità al TMZ in un pannello di linee cellulari e cellule di GBM derivate dai pazienti e arricchite in cellule staminali e abbiamo trovato valori di IC₅₀ compresi tra 174 e 1500 μ M (Figura 2, Pannello A e B).

Abbiamo testato su cellule di GBM l'attività di molecole di recente sviluppo che possiedono attività inibitoria su enzimi della famiglia KDM: JIB 04, che è un inibitore multi-KDM con un'attività inibitoria massima contro KDM5A³⁵ e CPI-455, una molecola che inibisce selettivamente la famiglia KDM5³⁶.

L'inibitore KDM multispecifico JIB 04 inibisce significativamente la proliferazione di linee cellulari di GBM e di colture primarie arricchite in cellule staminali (Figura 2 , Pannello C e Pannello D).

Abbiamo, quindi, generato tre linee cellulari U251 resistenti a diversi livelli di TMZ (200, 300 e 400 μ M) (Figura 2 Pannello E1) e le abbiamo trattate parallelamente alla linea parentale con JIB 04 per 24, 48, 72 e 96 ore. Come mostrato nella Figura 2, Pannello E2 dopo 24 ore di trattamento i valori IC₅₀ delle cellule resistenti alla TMZ erano significativamente inferiori rispetto a quelli delle cellule native. Dopo 48 ore, i valori IC₅₀ delle cellule resistenti erano circa la metà di quelli delle cellule native sebbene questa differenza non raggiungesse la significatività statistica mentre a 72 e 96 ore le cellule TMZ resistenti e native erano ugualmente sensibili a JIB 04 (Figura 2 Pannello E3).

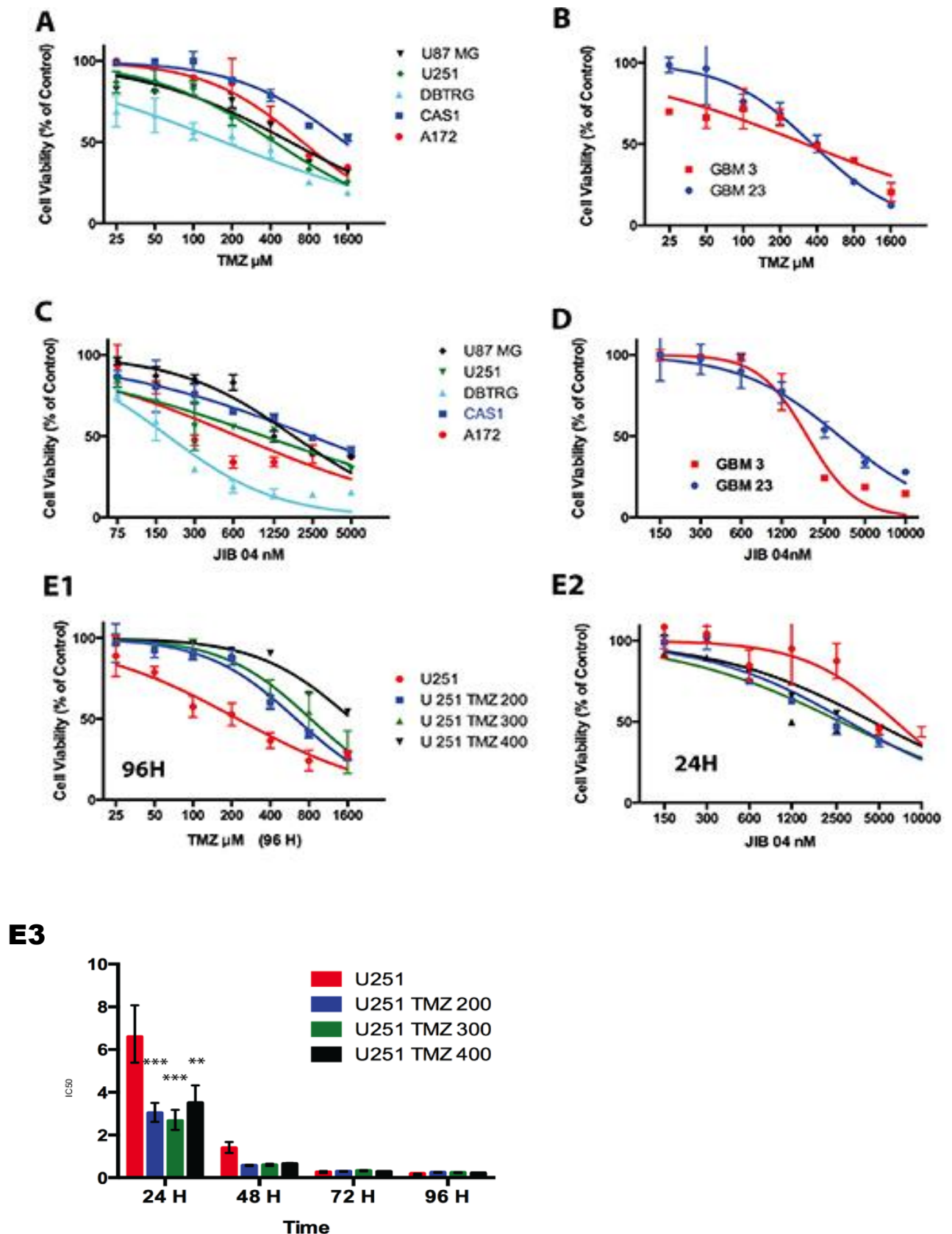


Figura 2: Pannello A e B: Effetto di TMZ misurato in MTS. Per ogni punto, rappresentante la media di 3 repliche sperimentali, è indicata la relativa SD. Tempo di trattamento con TMZ: 72 ore. Nel Pannello A linee cellulari di GBM (IC₅₀ di ogni linea: A172 731 μ M; CAS1 1544 μ M; DBTRG 175 μ M; U87 MG 573 μ M;

U251 431 μ M). Nel pannello B colture primarie di GBM arricchite in cellule staminali (I valori di IC50 sono stati: GBM3 324 μ M; GBM 23 356 μ M). Pannello C: Analisi MTS di linee cellulari GBM trattate 48 ore con JIB 04. Ogni punto rappresenta il valore medio di tre repliche. I valori IC50 calcolati sono stati: A172 647 nM; CAS1 2400 nM; DBTRG 186 nM; U251 1047 nM; U87 MG 1784 nM. Pannello D: Analisi MTS di colture primarie derivata dal paziente di GBM trattate per 96 ore con JIB 04. Ogni punto rappresenta il valore medio di tre repliche. Valori IC50: GBM 3 1860 nM, GBM 23 3200 nM. Pannelli E1 ed E2: Analisi MTS di cellule U251 esposte a TMZ (Pannello E) o JIB 04 (Pannello E2). U251 TMZ 200, TMZ 300 e TMZ 400 sono cellule U251 rese resistenti al TMZ dopo la crescita in 200, 300 o 400 μ M TMZ. Ogni punto dati rappresenta la media di tre repliche e di due esperimenti separati. Pannello E3: Plot dei valori di IC50 nelle cellule U251 e nelle stesse cellule rese resistenti alle dosi di 200, 300 o 400 μ M TMZ trattate con JIB 04 a 24, 48, 72 e 96 ore. La valutazione statistica è stata calcolata mediante l'ANOVA con la correzione di Bonferroni per le comparazioni multiple (*P=0,05; **P=0,01; ***P=0,001)

Abbiamo inoltre analizzato l'effetto di GSK J4 (inibitore di KDM6B) sulla proliferazione cellulare sia su linee continue (U251) che primarie (GBM3) e sia sulla linea parentale che sulla stessa linea diventata resistente al TMZ. Come evidenziato dai plot di Figura 3, nella linea continua U251 le cellule resistenti al TMZ sono meno proliferanti già dopo 24 ore di trattamento con GSK J4 rispetto alle cellule parentali, dato che si evidenzia maggiormente dopo 48 ore di trattamento. La coltura primaria GBM3 mostra una maggiore sensibilità al trattamento nella controparte resistente a 48 ore.

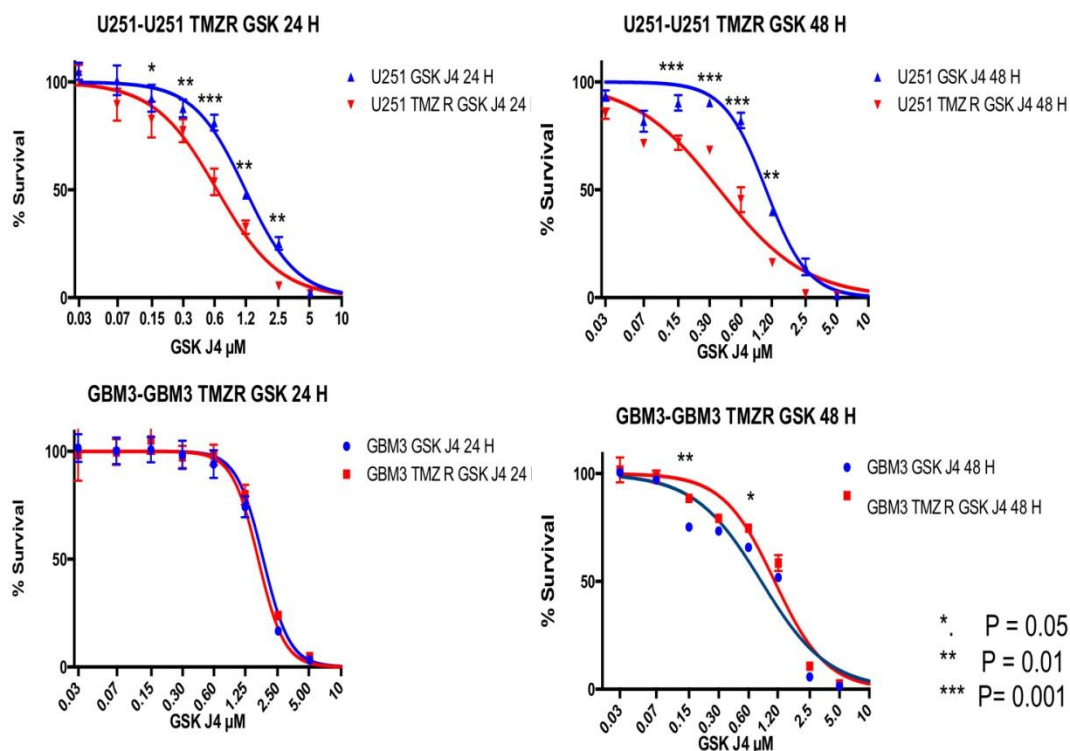


Figura 3: Saggi di proliferazione MTS su colture cellulari continue (U251 pannello superiore) e primarie (GBM3, pannello inferiore) trattate con GSK J4 a varie concentrazioni (range 0,03-10 μM) sulla linea parentale e sulla stessa linea resa resistente al TMZ a 24 ore (pannelli di sinistra) e a 48 ore (pannelli di destra)

Attività di JIB 04 su colture primarie di GBM coltivate in condizioni di staminalità e differenziamento

Abbiamo coltivato una coltura primaria di GBM in condizioni di staminalità o indotta a differenziare mediante l'aggiunta di siero al terreno di coltura. In condizioni di differenziamento le cellule riducono la loro attività proliferativa, fino ad annullarla, subendo al contempo cambiamenti morfologici (Figura 4, pannello A). Le cellule staminali e quelle differenziate presentano una sensibilità differente al JIB 04 in quanto le cellule differenziate

risultano più resistenti ad un ampio intervallo di concentrazioni rispetto alla loro controparte arricchita in cellule staminali, proliferante (Figura 4, pannello B).

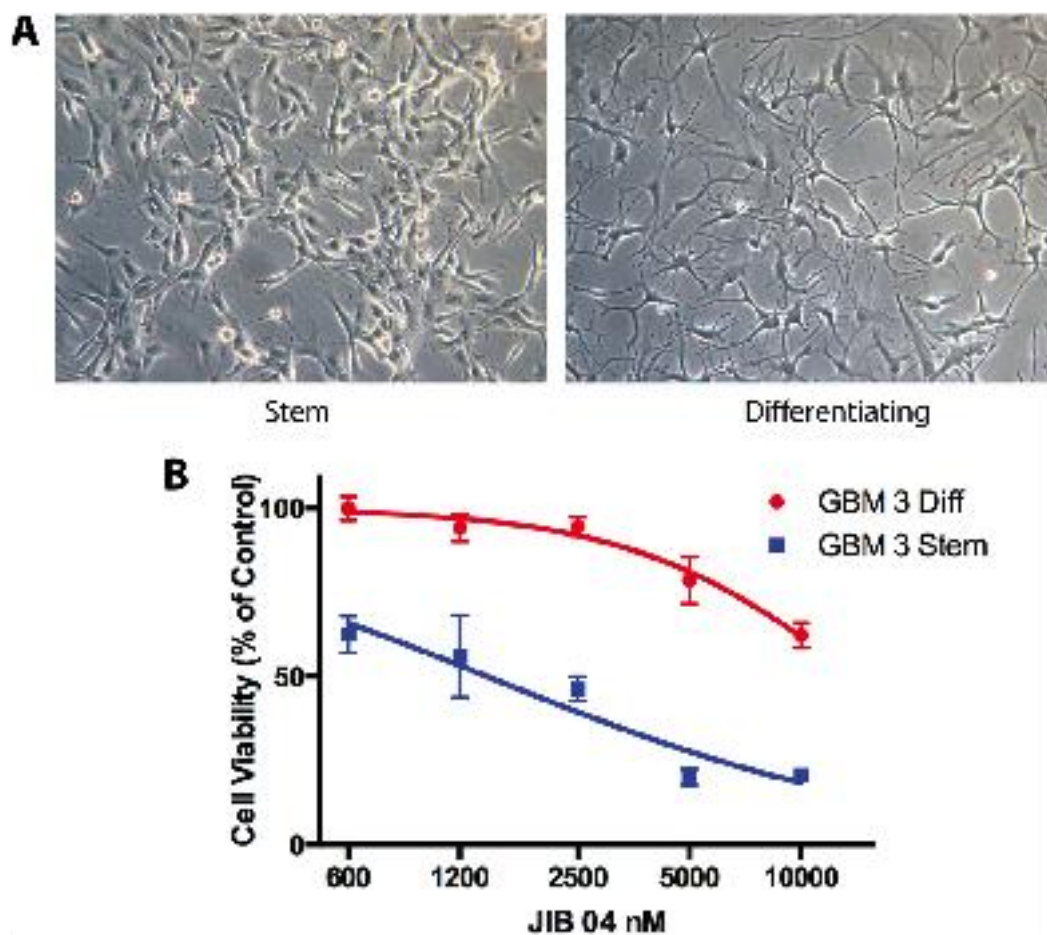


Figura 4: Pannello A: morfologia delle cellule GBM3 cresciute in condizioni di staminalità (immagine a sinistra) e di differenziazione (immagine a destra). Pannello B: Saggio MTS sulle cellule GBM3 staminali e differenziate trattate a concentrazioni crescenti con JIB 04

Superamento della chemioresistenza del GMB utilizzando altri inibitori delle istone-demetilasi (KDM)

La molecola JIB 04 esercita la sua massima attività inibitoria contro KDM5A ma anche contro altre KDM ugualmente sovraesprese nelle cellule di glioma quindi risulta difficile, utilizzando questo inibitore, attribuire ad una demetilasi specifica un ruolo prioritario nella chemioresistenza. Per cercare di attribuire a specifiche KDM un ruolo nella chemioresistenza abbiamo considerato anche l'utilizzo di molecole inibitorie mono-specifiche come GSK J4 (inibitore di KDM6B). Per quanto riguarda il ruolo della famiglia KDM5 nella sopravvivenza delle cellule GBM resistenti alla TMZ abbiamo utilizzato CPI 455 (inibitore selettivo di KDM5A-D) su cellule di GBM parentali e cellule di GBM resistenti al TMZ.

Mentre CPI 455 ha un modesto ma significativo effetto sulla vitalità cellulare delle cellule GBM parentali solo ad alta concentrazione (

Figura 5 Pannello A), la sua attività contro le cellule resistenti alla TMZ risulta significativamente più forte (

Figura 5, Pannello B). Analoghi risultati rispetto alla maggiore attività sulle cellule TMZ R sono stati ottenuti con GSK J4 come già osservato in Figura 3.

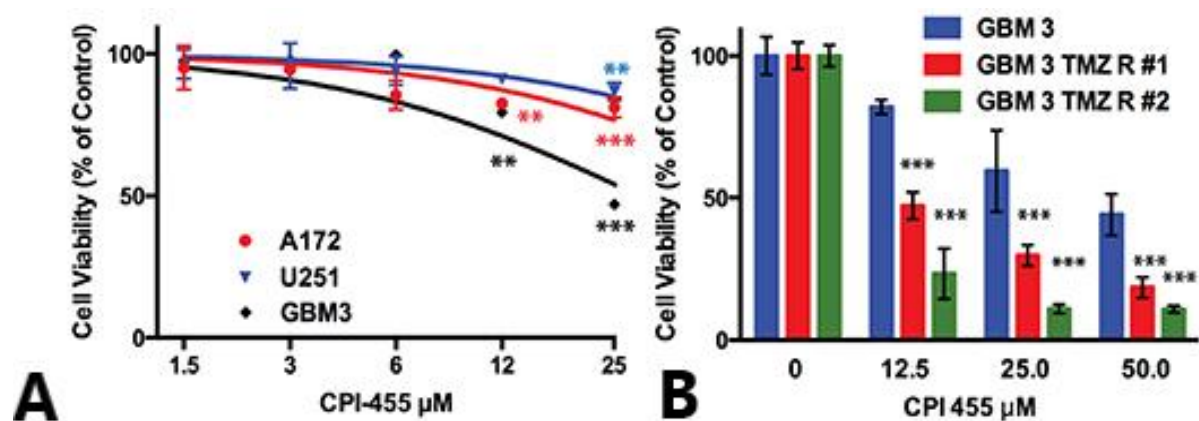


Figura 5: Pannello A: MTS di linee e colture primarie di GBM trattate con l'inibitore di KDM5 CPI-455 (120 ore di trattamento). Pannello B: Plot della sensibilità a CPI-455 determinata con MTS di due diversi cloni di GBM3 resistenti a TMZ (in rosso e in verde) rispetto alla linea parentale GBM3. Le significatività statistiche sono state valutate con l'ANOVA.

Sebbene sia JIB 04 che CPI 455 e GSK J4 siano molecole attive contro le cellule di GBM resistenti alla TMZ, abbiamo focalizzato lo studio su JIB 04 perché rispetto a CPI 455 la sua IC50 è molto inferiore, rendendo più semplice, in linea di principio, raggiungere concentrazioni clinicamente rilevanti per studi *in vivo* e perché rispetto a GSK J4, gli effetti funzionali *in vitro* sembrano essere più rilevanti.

Il trattamento con JIB 04 modula l'espressione dei geni coinvolti nel controllo della crescita delle cellule tumorali e porta all'aumento di metilazione dell'istone H3 alla lisina 4 (H3K4m3)

Nelle linee cellulari GBM A172 e U251 abbiamo esaminato l'effetto di JIB 04 sulla trascrizione di due geni coinvolti nel processo proliferativo (CCNB1 e PCNA) e di altri due geni che agiscono come soppressori tumorali (DEPP e DDIT4). DEPP, un gene di risposta

allo stress cellulare, porta all'attivazione della via autofagica ³⁷ mentre DDIT4 è un gene che reagisce all'ipossia e al danno al DNA e attiva l'apoptosi mediata da p53³⁸.

Un breve trattamento di JIB 04 per 4 ore delle cellule A172 e U251 diminuisce l'espressione dei geni CCNB1 e PCNA e aumenta fortemente l'espressione dei geni DEPP e DDIT4 (Figura 6 del pannello A).

Per meglio caratterizzare il meccanismo di sovraespressione del gene DEPP indotta da JIB 04, abbiamo eseguito l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con un anticorpo contro H3K4m3 seguita da Real Time PCR semiquantitativa. Coerentemente con l'attività inibitoria di JIB 04 su KDM5A, la regione della cromatina a monte del sito di inizio della trascrizione di DEPP è risultata arricchita in H3K4m3 (Figura 6 del pannello B).

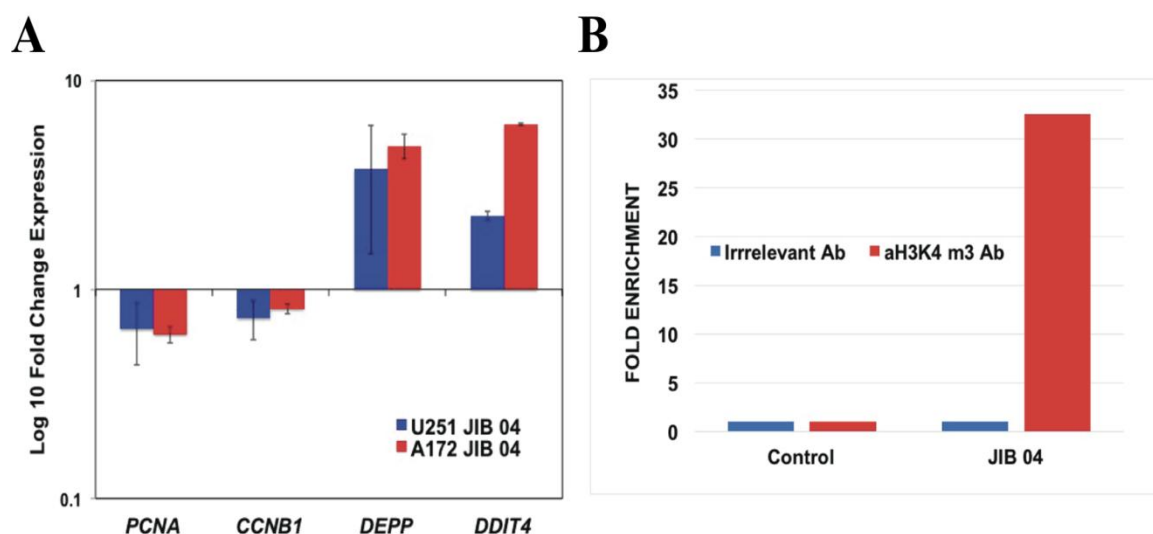


Figura 6: Pannello A: Espressione di geni PCNA, CCNB1, DEPP e DDIT4 in cellule A172 e U251 esposte a JIB 04 500nM per 4 ore normalizzate contro cellule non trattate (fold-change=1.0). Pannello B:

Immunoprecipitazione della cromatina con un anticorpo contro H3K4 me3 (e con un anticorpo irrilevante per la valutazione del livello di background) di cellule A172 non trattate e trattate con JIB 04 per 4 ore.

L'immunoprecipitato è stato poi amplificato in Real Time PCR semiquantitativa con un set di primer per la regione promotrice di DEPP. Nelle cellule trattate con JIB 04 abbiamo osservato un incremento maggiore di 30 volte in H3K4me3 rispetto all'anticorpo irrilevante.

Effetti funzionali del trattamento con JIB 04 su cellule di GBM

JIB 04 attiva l'autofagia in cellule di GBM

Per determinare se la sovraespressione di DEPP in risposta al JIB 04 potesse attivare la via autofagica, abbiamo misurato, mediante citometria a flusso, l'estensione della traslocazione di LC3 negli autofagosomi³⁹ in cellule A172 e U251 trattate con JIB 04 per 4 ore. Come mostrato nella

Figura 7, l'esposizione a JIB 04 per 4 ore, ha indotto autofagia di 4,0 e 5,1 volte (profilo rosso) rispetto alle cellule non trattate (profilo grigio) rispettivamente in A172 e U251.

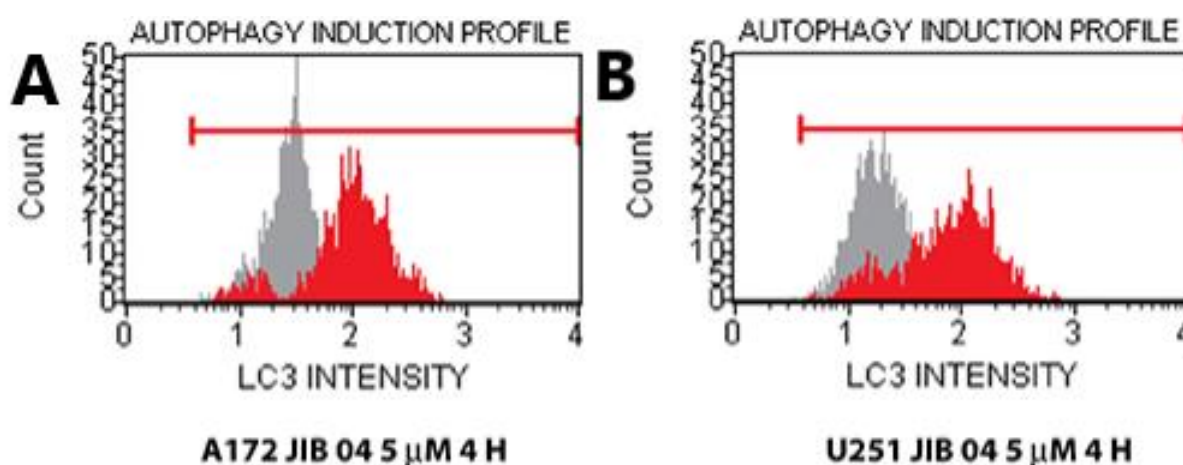


Figura 7: Analisi citofluorimetrica della traslocazione di LC3 negli autofagosomi dopo trattamento di cellule di GBM A172 e U251 con JIB 04 per 4 ore. I profili rosso e grigio rappresentano rispettivamente il campione di test e di controllo. L'induzione dell'autofagia è il rapporto tra l'intensità media dell'autofagia del campione trattato e quella del campione di controllo non trattato

JIB 04 induce apoptosi in cellule di GBM

Un'esposizione più lunga (48-96 ore) a JIB 04 ha portato all'induzione dell'apoptosi dipendente dal tempo di trattamento considerando un'ampia gamma di concentrazioni sia

nelle colture primarie che nelle linee cellulari, nonché nelle cellule di GBM resistenti al TMZ (Figura 8).

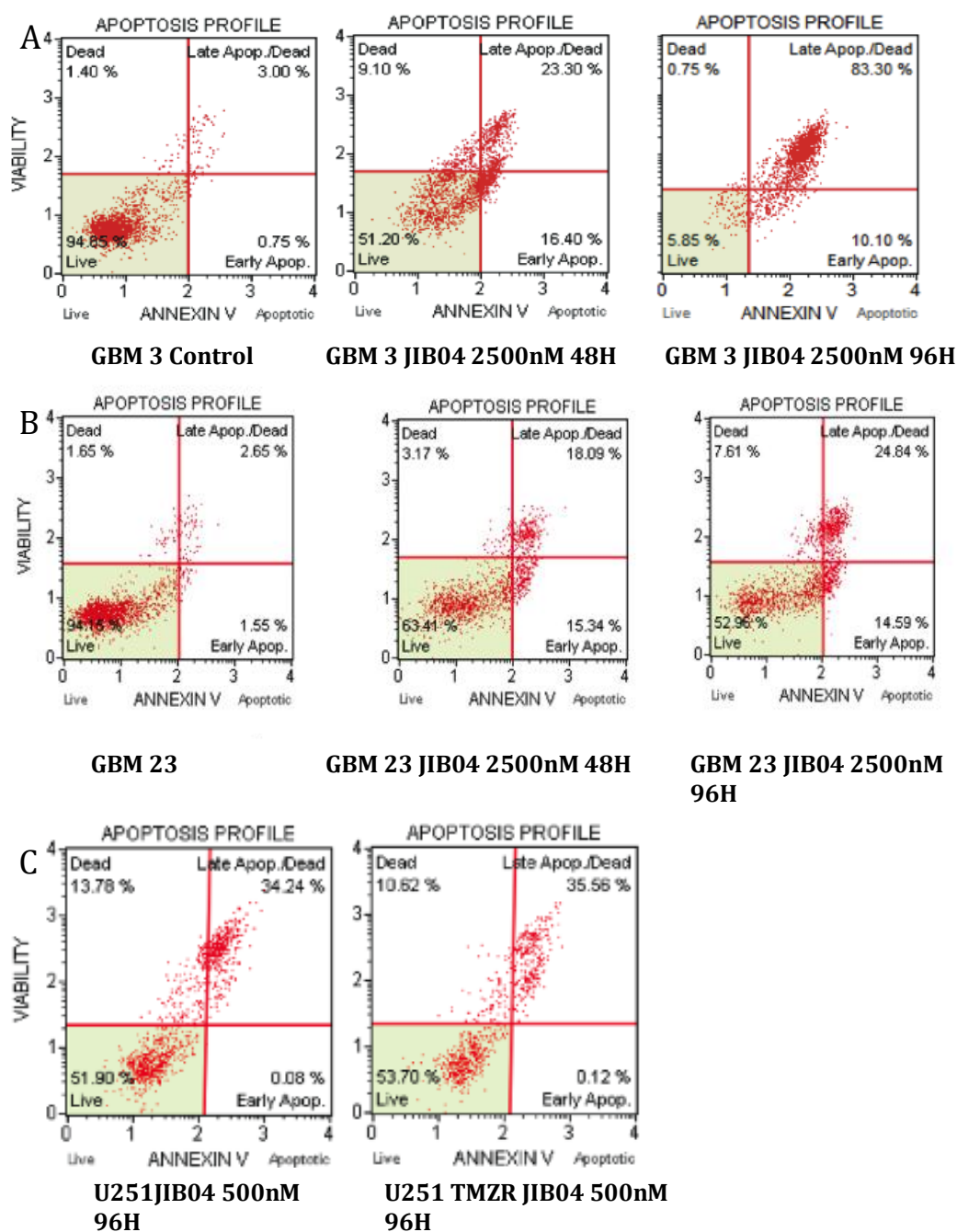


Figura 8: Scatterogrammi che mostrano l'induzione di apoptosi da parte di JIB 04, valutata mediante colorazione con Annexin V. Pannello A: Coltura primaria arricchita in cellule staminali GBM 3 dopo trattamento con JIB 04 2500 nM per 48 e 96 ore. Pannello B: Coltura primaria arricchita in cellule staminali GBM 23 trattata con JIB 04 per 96 ore. Pannello C: Cellule U251 parentali e resistenti al TMZ trattate con JIB 04 500nM per 96 ore.

JIB 04 induce l'inattivazione del pathway PI3K

Abbiamo studiato tramite citofluorimetria l'effetto di JIB 04 sulla fosforilazione di Akt a livello della Ser473, una modifica attivante di Akt. Abbiamo analizzato un pannello di cellule primarie e di linee cellulari di GBM e scoperto che il livello basale di fosforilazione di Akt è ampiamente variabile (da oltre l'80% a meno del 5% di cellule positive).

Nella linea U251 la maggior parte delle cellule presenta fosforilazione di Akt ma il trattamento con 1 μ M JIB 04 per un'ora è stato sufficiente a ridurne significativamente i livelli e ad aumentare la frazione di cellule con Akt non attivato.

Dopo 24 ore, l'effetto di JIB 04 sulla fosforilazione di Akt è stato ancora più rilevante e, nella maggior parte delle cellule, Akt è risultato inattivato (Figura 9, pannello A).

In A172 Akt è costitutivamente inattivo in più del 70% delle cellule (Figura 9, pannello B), tuttavia, il trattamento con JIB 04 ha comportato la significativa riduzione del numero di cellule recanti la forma attivata di Akt (dal 23,1 al 6,5%) con il conseguente aumento di quelle con la forma inattiva. Dopo 24 ore di trattamento, nel 91,1% delle cellule Akt è stato inattivato.

Nelle cellule U251 TMZ resistenti, la fosforilazione di Akt era superiore a quella della controparte parentale (77,5% vs 63,9%) e la diminuzione della fosforilazione di Akt in seguito al trattamento con JIB 04 era significativa ma molto meno evidente di quella delle cellule parentali dopo 1 ora di trattamento.

Tuttavia, dopo 24 ore la diminuzione della fosforilazione è risultata molto più evidente e statisticamente significativa (Figura 9, Pannello C).

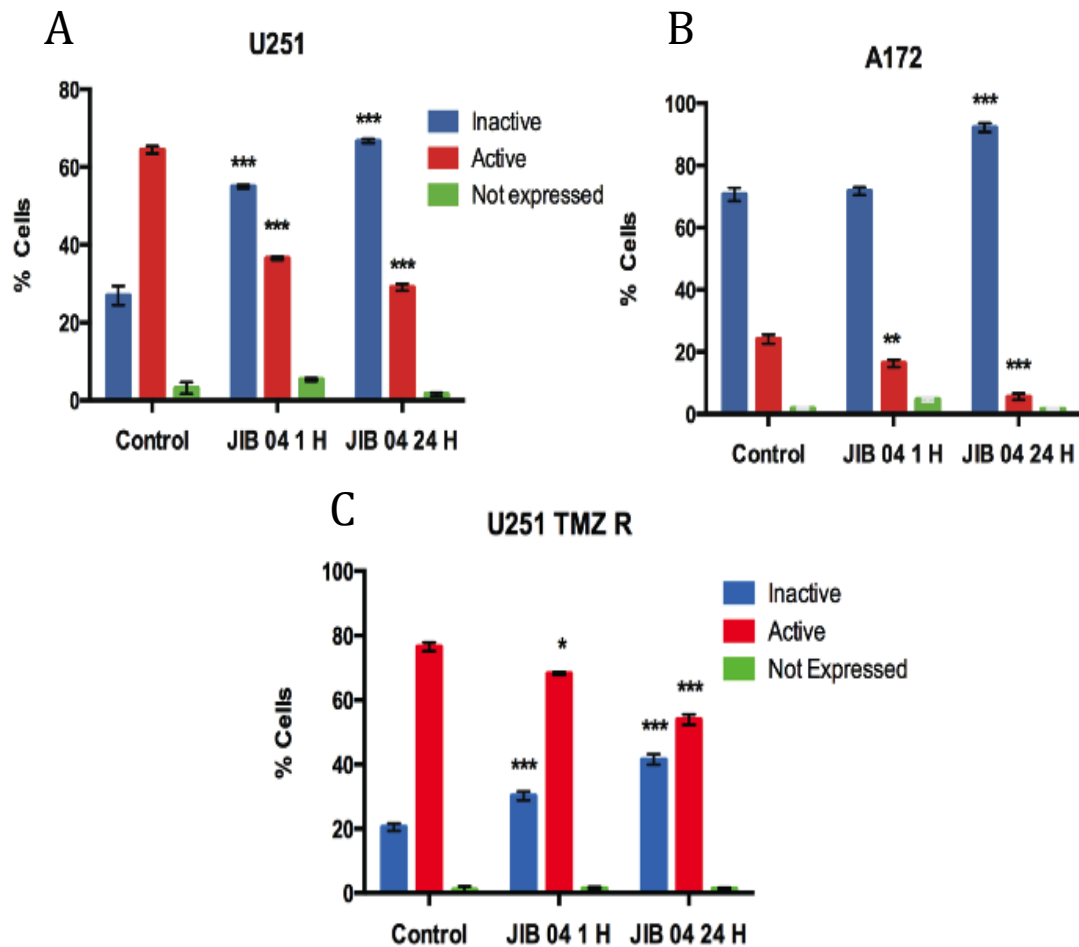


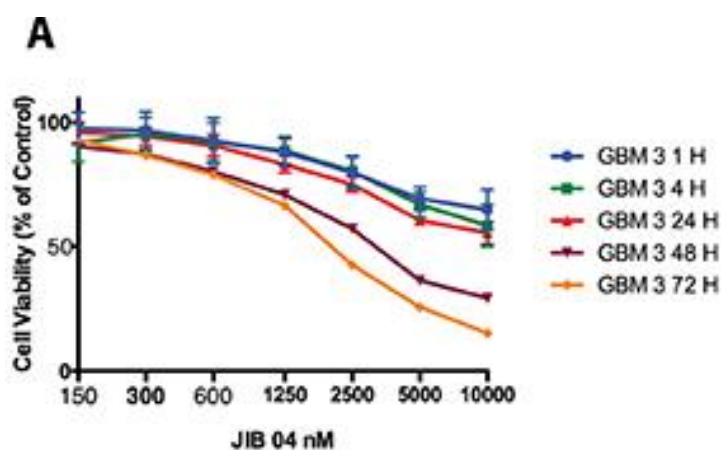
Figura 9: Analisi citofluorimetrica della fosforilazione di Akt dopo 1 e 24 ore di trattamento con JIB 04 in cellule U251 (Pannello A) e A172 (Pannello B). I grafici mostrano la presenza di una significativa diminuzione della fosforilazione di Akt che indica l'inattivazione della via PI3K. Il significato delle differenze rispetto alle cellule non trattate è stato calcolato con l'ANOVA con la correzione di Bonferroni per confronti multipli ed è indicato per ciascun punto (* P = 0,05; ** P = 0,01; *** P = 0,001). Esperimenti in duplicato. Pannello C: Analisi citofluorimetrica della fosforilazione di Akt dopo 1 e 24 ore di trattamento con JIB 04 di cellule U251 resistenti alla TMZ. Questi grafici mostrano la presenza di una significativa diminuzione della fosforilazione di Akt che indica l'inattivazione della via PI3K. E' stato rappresentato il valore medio di due esperimenti. Il significato delle differenze rispetto alle cellule non trattate è stato calcolato con l'ANOVA con la correzione di Bonferroni per confronti multipli ed è indicato per ciascun punto (* P = 0,05; ** P = 0,01; *** P = 0,001).

JIB 04 è una molecola ad azione rapida che inibisce la clonogenicità.

La defosforilazione di Akt dopo un'ora di esposizione delle cellule a JIB 04 ci ha indotti ad indagare sulle conseguenze biologiche di questo breve trattamento.

Inizialmente abbiamo misurato la vitalità cellulare mediante MTS dopo il trattamento della coltura cellulare primaria GBM3 con JIB 04. Come mostrato nella Figura 10, Pannello A e nella Tabella 3, la significativa riduzione della vitalità cellulare risulta tempo e dose-dipendente ed è rilevabile, ad alte concentrazioni di JIB 04, un'ora dopo l'inizio del trattamento. L'entità della riduzione è leggermente aumentata dopo 4 e 24 ore raggiungendo il livello massimo dopo 72 ore di trattamento.

Abbiamo inizialmente testato l'effetto di JIB 04 sulla clonogenicità dopo trattamenti di 24 e 48 ore e abbiamo scoperto che, in queste condizioni, non è stato possibile rilevare colonie in cellule GBM native o resistenti a TMZ alle concentrazioni testate (600 e 1200 nM, dato non mostrato).



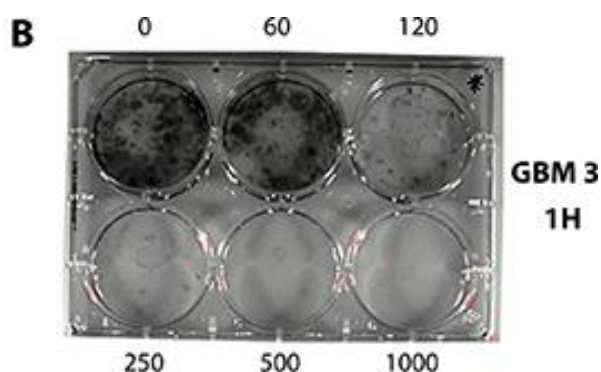


Figura 10: Pannello A: Cinetica dell'attività di JIB 04 su cellule GBM3 a 1, 4, 24, 48 e 72 ore di trattamento che dimostra che la riduzione della vitalità cellulare diventa evidente dopo 1 ora di trattamento alle più alte concentrazioni di farmaco. Pannello B: Clonogenicità della coltura primaria arricchita in cellule staminali GBM3 dopo un trattamento di un'ora con JIB 04. Intervallo di concentrazioni: 60-1000 nM).

Treatment Time	JIB 04 nM						
	150	300	600	1200	2500	5000	10000
1 H	NS	NS	NS	*	**	***	***
4 H	NS	NS	NS	NS	**	***	***
24 H	NS	NS	NS	**	***	***	***
48 H	NS	*	***	***	***	***	***
72 H	NS	*	***	***	***	***	***

One-way ANOVA. Significance (Bonferroni post hoc) of each data point compared to the untreated control.

NS: not significant.

* $P < 0.05$.

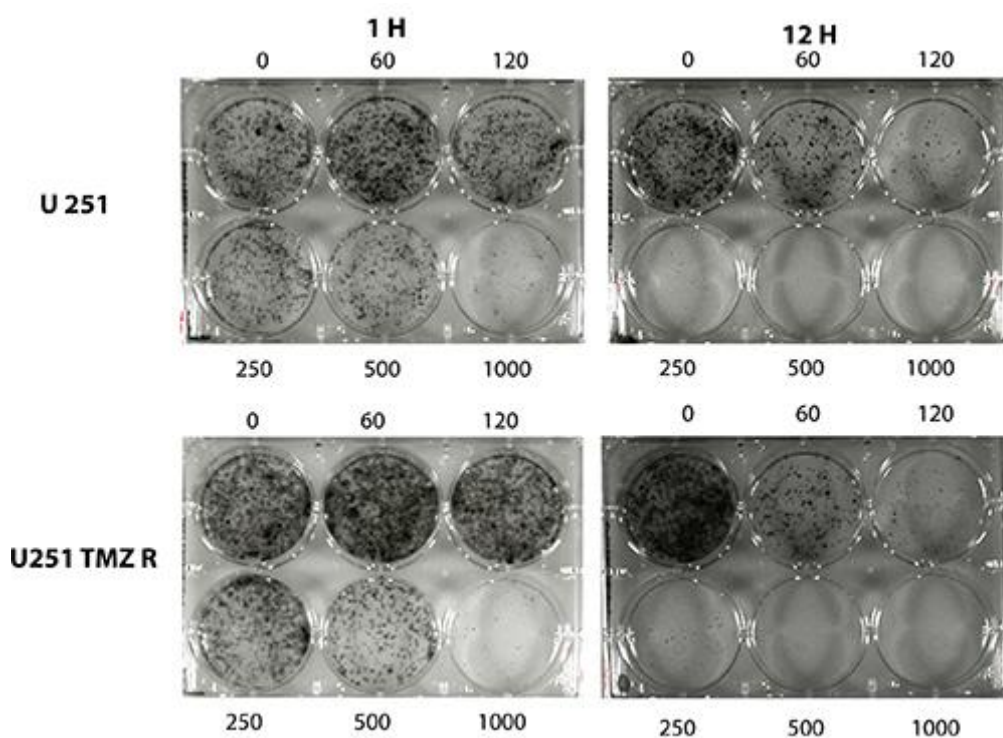
** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

Tabella 3: Valutazione della significatività statistica della sensibilità di GBM3 a vari tempi di trattamento e varie concentrazioni di JIB 04 nel grafico di Figura 10, Pannello A.

L'effetto di JIB 04 sulla clonogenicità è evidente anche a basse concentrazioni e tempi di esposizione brevi. In effetti, la drastica riduzione della proprietà clonogenica delle cellule può essere osservata, in linee cellulari e colture primarie, anche dopo 1 ora di trattamento (Figura 10 Pannello B e Figura 11 Pannello A e B). È importante sottolineare che il potente effetto inibitorio di JIB 04 sulla formazione di colonie non è limitato alle cellule native e si estende con cinetiche simili alle cellule resistenti alla TMZ (Figura 11, Pannelli A e B).

A



B

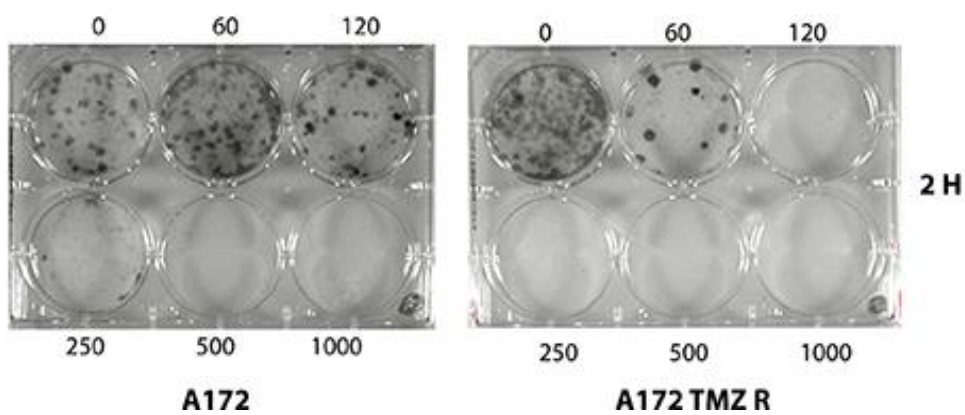


Figura 11: Pannello A: Clonogenicità dell'U251 (parte superiore del pannello) e U251 TMZ R (parte inferiore) cellule GBM dopo 1 e 12 ore di trattamento con JIB 04. Gamma di concentrazioni 60-1000 nM. Pannello B: Clonogenicità di cellule A172 (a sinistra) e di A172 TMZ R (a destra) dopo 2 ore di trattamento con JIB 04. Gamma di concentrazioni 60-1000 nM.

JIB 04 sinergizza con TMZ inducendo citotossicità sulle cellule di GBM

Poiché uno dei problemi clinici più rilevanti nell'uso della chemioterapia nel GBM è l'incorrere dei pazienti nella chemioresistenza e dal momento che JIB 04 sembra essere citotossico particolarmente nei confronti delle cellule resistenti al TMZ stesso, abbiamo valutato la possibilità di utilizzare la molecola in una strategia di tipo adiuvante con il TMZ.

Abbiamo eseguito esperimenti preliminari di combinazione tra le due molecole coltivando le cellule A172 e GBM 3 con TMZ e JIB 04 somministrandoli insieme ma utilizzando diverse strategie di combinazione e monitorandone gli effetti mediante MTS e l'analisi dell'apoptosi.

Le relazioni dose-effetto della combinazione di farmaci sono state valutate utilizzando la legge di azione di massa e le equazioni relative all'effetto mediano riscontrato per calcolare l'indice di combinazione (CI) come misura dell'interazione tra TMZ e JIB 04 come descritto da Chou e Talalay⁴⁰. Secondo questa equazione, un $CI < 1$ è indicativo di una sinergia tra due farmaci mentre $CI = 1$ e $CI > 1$ indicano rispettivamente effetti additivi o antagonisti.

Come mostrato nella Figura 12 nel pannello A, la combinazione di TMZ e JIB 04, ha mostrato un debole sinergismo tra le due molecole ($CI: 0,30-0,71$). La sinergia tra le due molecole è diventata invece molto forte quando le cellule sono state esposte a TMZ per 48 ore seguite da ulteriori 12 ore di trattamento con TMZ in associazione a JIB 04 ($IC: 0,02-0,1$) (Figura 12, pannello B).

Un risultato contrastante è stato inizialmente ottenuto quando abbiamo testato la combinazione TMZ-JIB 04 sulla coltura primaria GBM 3 arricchita in cellule staminali. Come mostrato in Figura 12, Pannello C, le due molecole hanno mostrato un effetto antagonista da moderato a forte se utilizzate contemporaneamente ($CI: 2,1 \rightarrow 10$). Tuttavia, quando le cellule sono state esposte dapprima a TMZ per 48 ore e poi a JIB 04 per 12 ore, questa combinazione ha mostrato, come per A172, un effetto sinergico che si è trasformato in additivo solo alla concentrazione di farmaco più bassa ($CI: 0,44-1,06$) (Figura 12

Pannello D). Anche se da un lato questo risultato probabilmente riflette l'eterogeneità cellulare delle colture di GBM primarie che imitano la complessità molecolare e cellulare del tumore, la strategia di somministrazione di JIB 04 nella fase finale del trattamento con TMZ sembra essere, nel caso di entrambi i tipi cellulari, la più efficace.

Sebbene non abbiamo ancora una chiara spiegazione funzionale per spiegare la sinergia tra JIB 04 e TMZ quando somministrati sequenzialmente, ipotizziamo che, nelle nostre condizioni sperimentali, questo effetto potrebbe essere il risultato della diversa interferenza di TMZ e JIB 04 sul ciclo cellulare. È noto che le cellule di GBM trattate con TMZ si accumulano al checkpoint della fase G2 (Figura 13, Pannello centrale). Abbiamo dimostrato che una parte delle cellule che acquisiscono la resistenza al TMZ superano il checkpoint in G2 e continuano a proliferare entrando in fase G1 (Figura 13, Pannello a destra). L'analisi del ciclo cellulare delle cellule di GBM trattate con JIB 04 per 48 ore, mostra un accumulo progressivo di cellule dose-dipendente in fase G0 / G1 (Figura 14). La nostra ipotesi è che JIB 04 intercetti le cellule che sfuggono alla fase G2 prima che queste riprendano il ciclo cellulare e possano acquisire nuove mutazioni che le potranno rendere permanentemente resistenti ai farmaci.

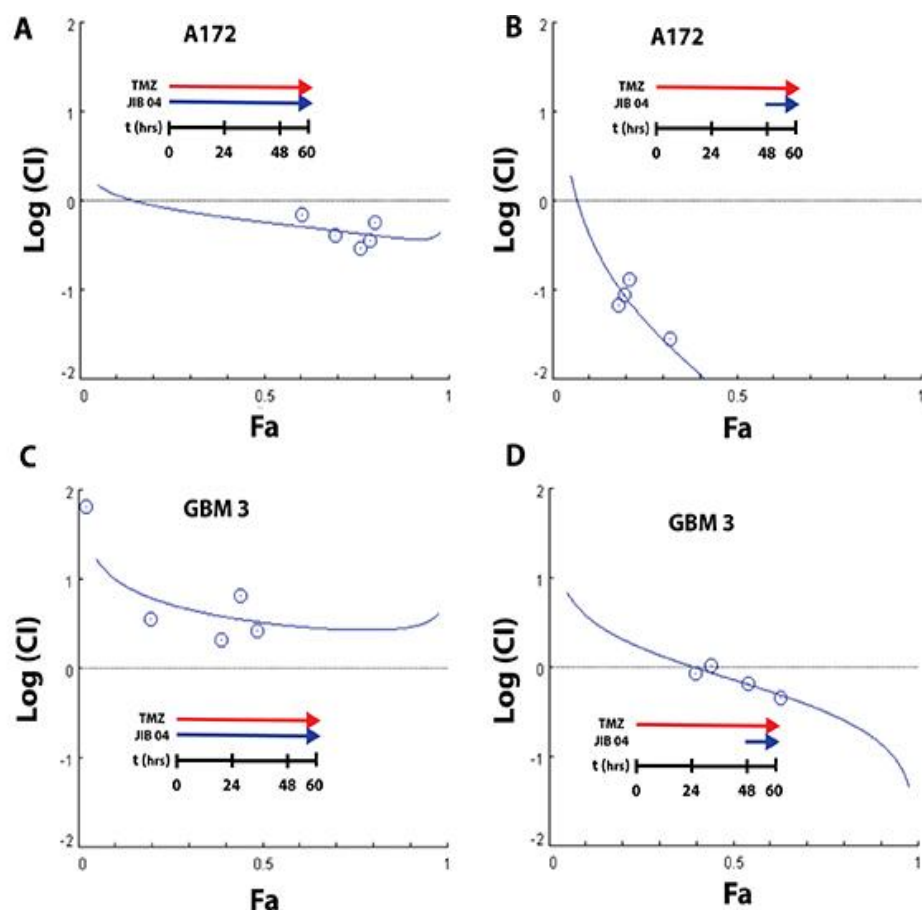


Figura 12: Sinergia tra JIB 04 e TMZ. Pannello A: Rappresentazione grafica dell'indice log (CI) sull'effetto (Fa) del trattamento JIB 04 delle cellule A172. L'induzione dell'apoptosi misurata mediante colorazione con Annexin V è stata considerata come effetto per valutare l'efficacia dei trattamenti. Ogni punto nei grafici rappresenta la media di analisi effettuate in duplicato. Le cellule sono state incubate per 60 ore con un rapporto costante tra le due molecole ($JIB\ 04/TMZ = 1/500$). Il plot dell'IC indica una sinergia moderata tra le due molecole. Pannello B: Cellule A172 trattate con le stesse concentrazioni di TMZ e JIB 04 ma con un differente piano di somministrazione: le cellule sono state incubate per 48 ore con TMZ da solo, e per 12 ore successive con TMZ e JIB 04. La trama del CI indica una fortissima sinergia tra le due molecole. Pannello C: Rappresentazione grafica dell'indice log (CI) rispetto all'effetto (Fa) del trattamento con JIB 04 su colture primarie di GBM3. L'effetto considerato è stato la vitalità cellulare misurata in MTS. Ogni punto rappresenta la media di tre repliche sperimentali. Le cellule sono state incubate per 60 ore con un rapporto costante tra le due molecole ($JIB\ 04/TMZ = 1/500$). Il plot dell'IC indica un antagonismo da modesto a moderato tra le due molecole. Pannello D: Le cellule GBM3 sono state incubate per 48 ore con TMZ da solo, seguite da 12 ore di trattamento combinato TMZ e JIB 04 (rapporto tra le due molecole: $JIB\ 04/TMZ = 1/500$). La trama dell'IC indica un effetto additivo alla concentrazione più bassa e una sinergia moderata tra le due molecole a concentrazioni più elevate.

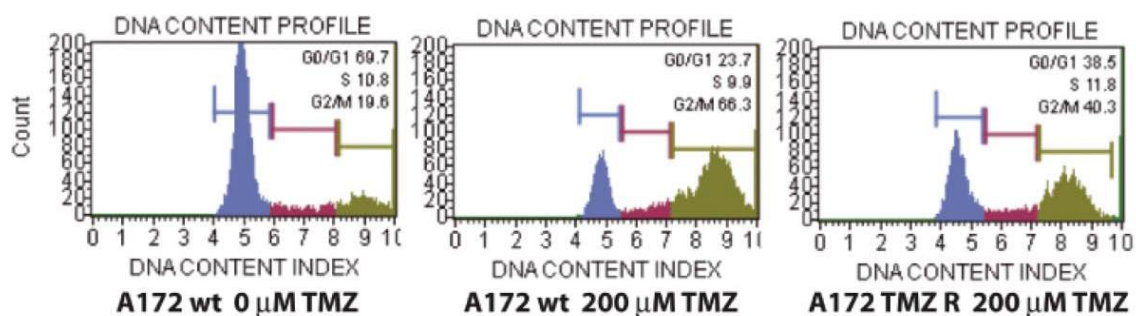


Figura 13: Analisi del ciclo cellulare di cellule A172: Nel pannello a sinistra le cellule A172 non trattate (primo pannello). Nel secondo pannello le cellule A172 sono trattate con TMZ 200 μ M; si noti il blocco e il conseguente accumulo di cellule in fase G2/M, effetto del trattamento. Nel terzo pannello, a destra lo stesso trattamento è stato effettuato su Cellule A172 TMZ resistenti (TMZ R). Una parte di queste cellule “sfugge” al blocco del ciclo cellulare in G2/M indotto dal TMZ come evidenziato dalle percentuali di cellule che diminuiscono in G2/M e aumentano in G0/G1.

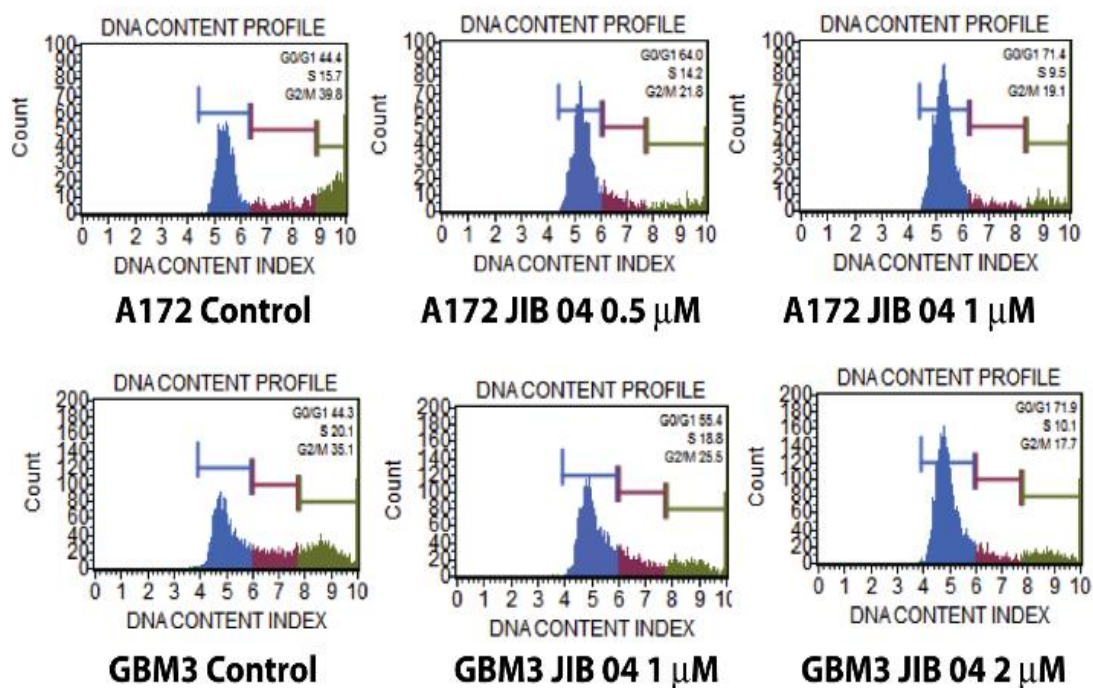


Figura 14: Analisi del ciclo cellulare delle cellule A172 e GBM3 esposte a JIB 04 per 48 ore che mostrano l'accumulo progressivo dose-dipendente delle cellule in G0 / G1.

Analisi *in vivo* dell'effetto di JIB 04

Abbiamo valutato la tossicità di JB 04 mettendo a confronto differenti lotti del farmaco commercializzato da due diversi produttori: Tocris (Bristol, UK) o Selleckchem (Munich, Germany) e abbiamo stabilito che l'effetto sulla proliferazione cellulare *in vitro* fosse sostanzialmente equivalente tra JIB 04 di diverse aziende (Figura 15).

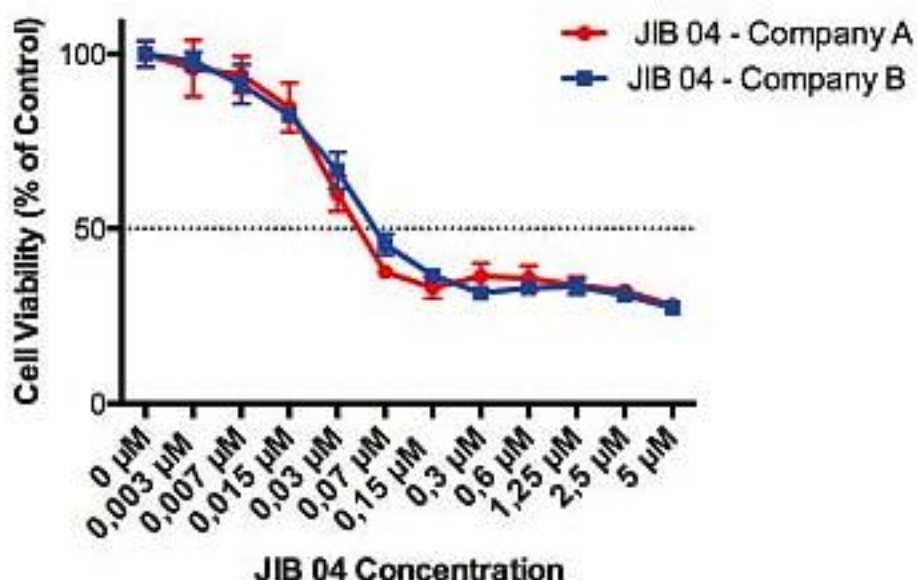


Figura 15: Analisi MTS di cellule A172 che mostrano lo stesso effetto dopo il trattamento con JIB 04 commercializzato da due diverse aziende.

Per identificare e quantificare JIB 04 dimostrando anche il passaggio di JIB 04 attraverso la membrana ematoencefalica (BBB) abbiamo sviluppato un protocollo di spettrometria di massa per identificare in modo inequivocabile questa molecola in estratti di tessuto cerebrale e plasma (Figura 16).

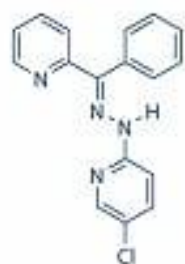
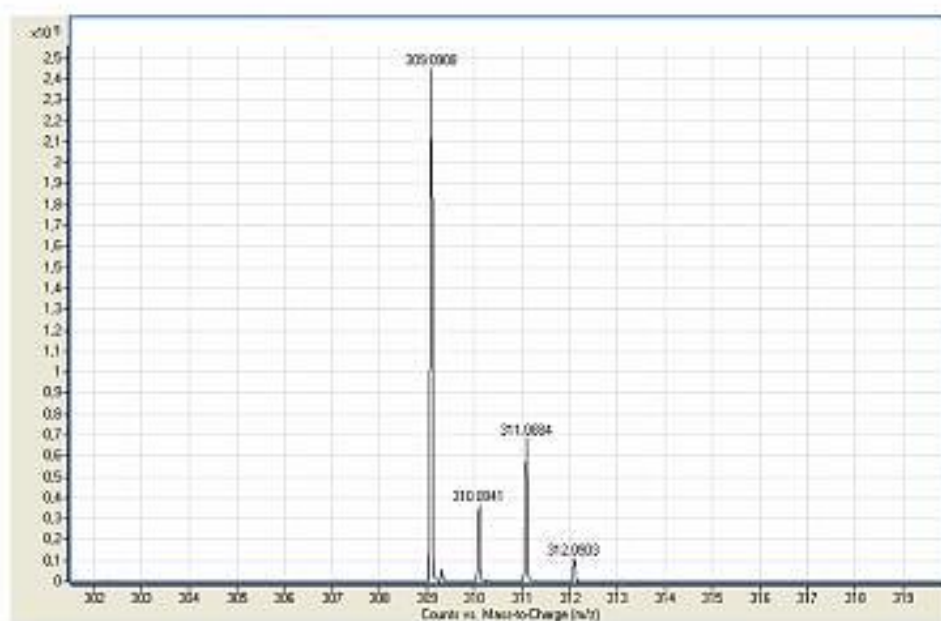
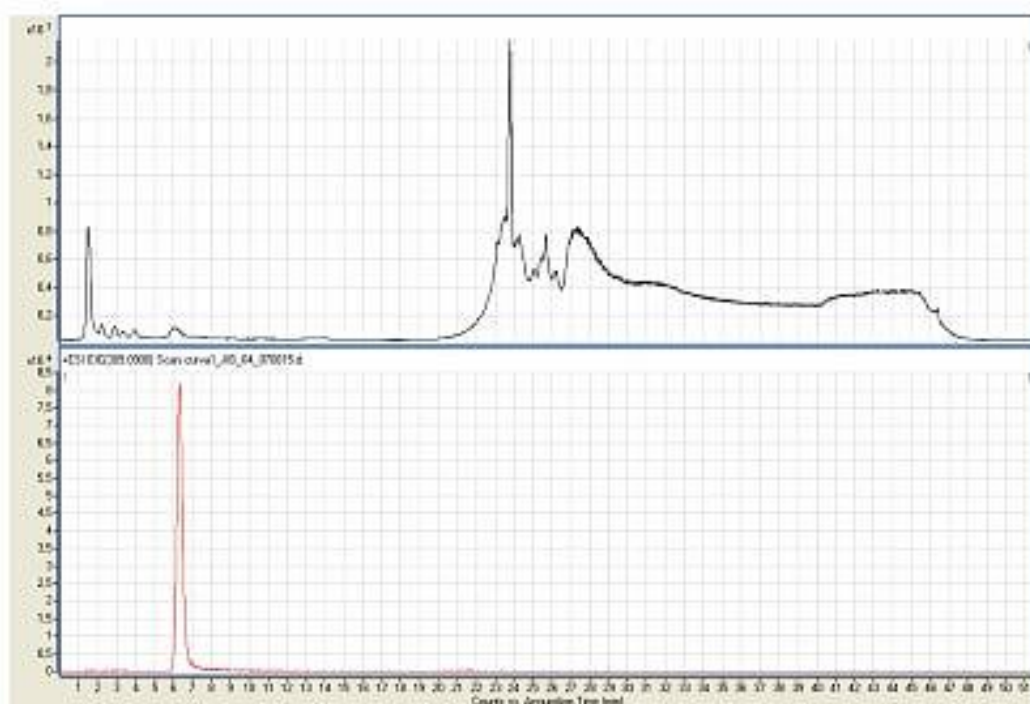
A**(C₁₇H₁₃ClN₄)****B****C**

Figura 16: Analisi di spettrometria di massa per l'identificazione di JIB 04 in campioni biologici. Pannello A: struttura chimica del JIB-04. Panel B: analisi MS in polarità positiva: schema isotopico di JIB-04. Pannello C: Analisi HPLC / MS dello standard JIB-04: corrente ionica totale (pannello superiore) e area di picco corrente di ioni estratti di m/z 309,09 $[M + H]^+$ (pannello inferiore).

Abbiamo valutato la tossicità di JIB 04 in relazione alla concentrazione utilizzata e abbiamo osservato in topi C57 BL6/J eventi avversi per concentrazioni di questa molecola comprese tra 80-110 mg/Kg. Abbiamo poi eseguito un'analisi preliminare sulla biodistribuzione su 6 topi C57 BL6/J trattati con 50 mg / kg di JIB 04 in un'unica somministrazione intraperitoneale. In queste condizioni abbiamo osservato un picco plasmatico di JIB 04 a 30 minuti e una sua relativa diminuzione a 6 ore. La spettrometria di massa dell'estratto totale del cervello, a 5 giorni dalla somministrazione, mostrava una quantità rilevabile di JIB 04, indicativa del passaggio della molecola attraverso la barriera ematoencefalica.

Per determinare se il cervello potesse essere raggiunto da una quantità clinicamente rilevante di JIB 04, abbiamo trattato giornalmente per 5 giorni 9 topi C57 BL6/J con 60, 40 e 20 mg/kg di JIB 04 (esemplificazione dello schema di trattamento in Figura 17). Abbiamo raccolto un campione di sangue a 30 minuti e a 6 ore; alla fine del trattamento i topi sono stati sacrificati e la concentrazione di JIB 04 è stata misurata nel cervello e nei campioni di plasma raccolti (Figura 18). Come mostrato nella Figura 19, JIB 04 era facilmente rilevabile nel cervello di topi sani con barriera ematoencefalica intatta e al dosaggio di 60 mg / kg la concentrazione nel cervello raggiungeva circa i 200 nM di JIB 04.

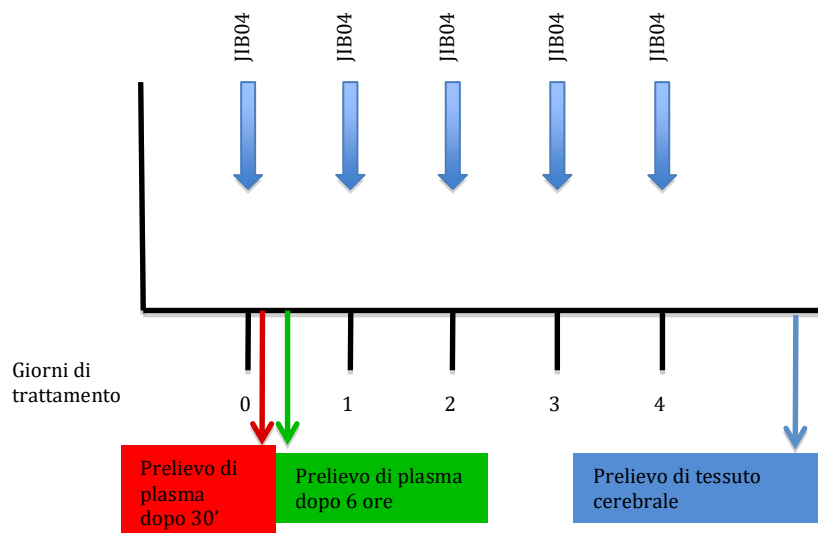


Figura 17: Schema di trattamento con JIB 04 nel modello murino C57 BL6/J. Lo schema consta di 5 somministrazioni intraperitoneali di JIB 04 e sono state testate diverse concentrazioni (60, 40 e 20 mg / kg) effettuate ogni 24 ore, con prelievo di plasma dopo 30 minuti e dopo 6 ore dalla prima somministrazione e con prelievo di tessuto cerebrale dopo il quinto giorno di trattamento.

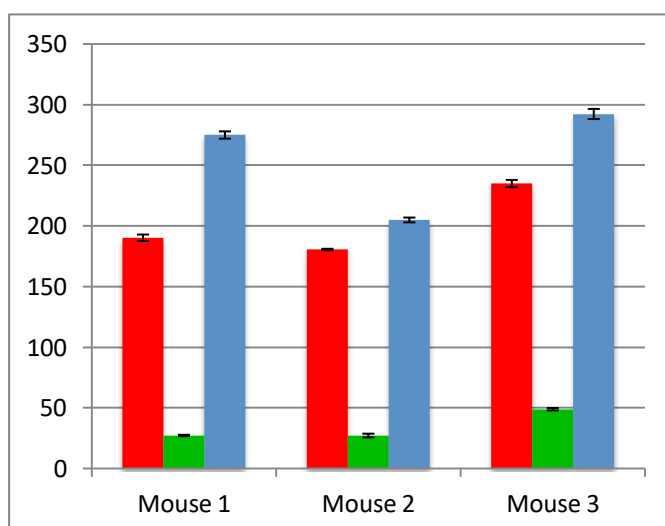


Figura 18: Esempio di metabolizzazione della molecola JIB 04 a 60 mg/Kg in tre dei topi C57 BL6/J trattati. In rosso e in verde il quantitativo di JIB 04 rilevato nel plasma a 30 minuti e 6 ore rispettivamente; in azzurro il quantitativo di JIB 04 rilevato del tessuto cerebrale dopo 5 somministrazioni giornaliere di JIB 04.

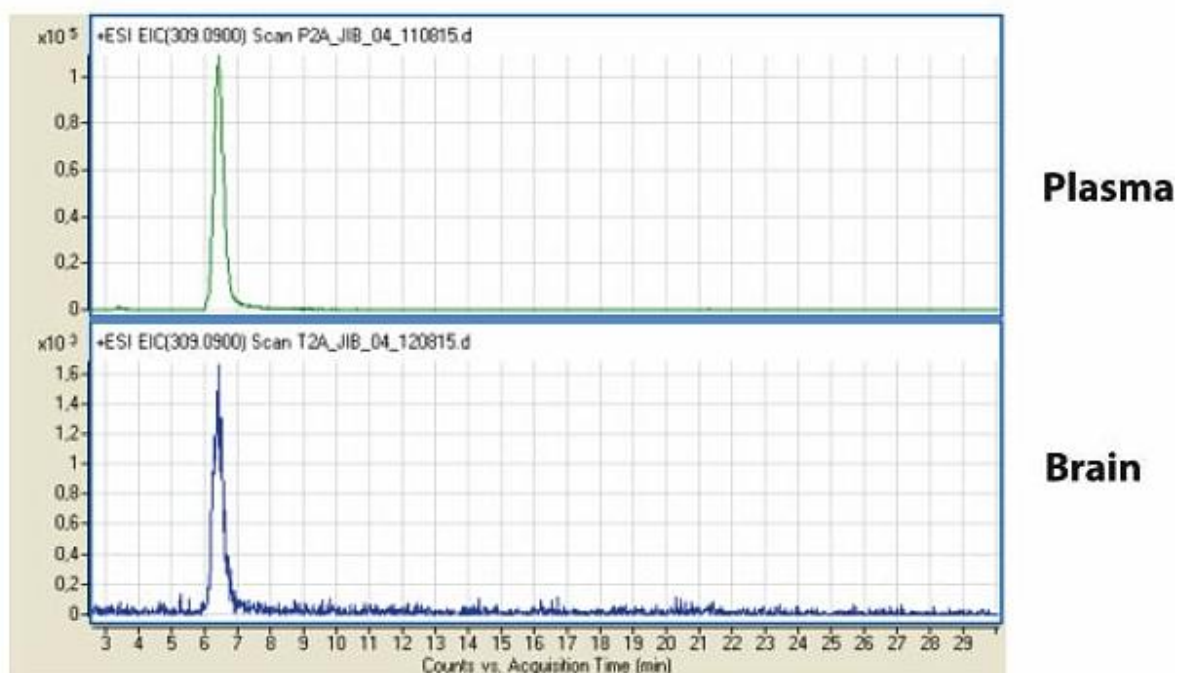


Figura 19: Farmacocinetica di JIB-04: corrente di ioni estratti di m/z 309,09 $[M + H]^+$ in estratti di plasma e cervello di topi trattati per 5 giorni con 60 mg / kg di JIB 04. La presenza di un picco identico corrispondente a quello di JIB 04 (vedi Figura 16 C, pannello inferiore) nei due estratti indica il passaggio della molecola attraverso la barriera ematoencefalica.

Abbiamo, infine, valutato l'effetto antitumorale di JIB 04 in modello murino ortotopico NOD-SCID. E' stato effettuato un trattamento pilota *in vivo* in 5 topi xenotrapiantati nel cervello con la linea di cellule di GBM DBTRG e, utilizzando come stimatore del prodotto limite la curva di Kaplan-Meier, abbiamo confrontato il risultato dei topi trattati con quello di altri 5 topi xenograft trattati con placebo. Come mostrato nella Figura 20, le curve di sopravvivenza dei topi trattati e di controllo erano chiaramente distinte, ma la differenza non ha raggiunto la significatività statistica probabilmente a causa del numero molto limitato di topi inclusi in questo studio pilota. Tuttavia, l'Hazard Ratio (HR) dei topi trattati con JIB 04

versus placebo era di 0,46, il che suggerisce che in effetti JIB 04 può interferire con la crescita delle cellule di glioblastoma *in vivo* in un contesto ortotopico.

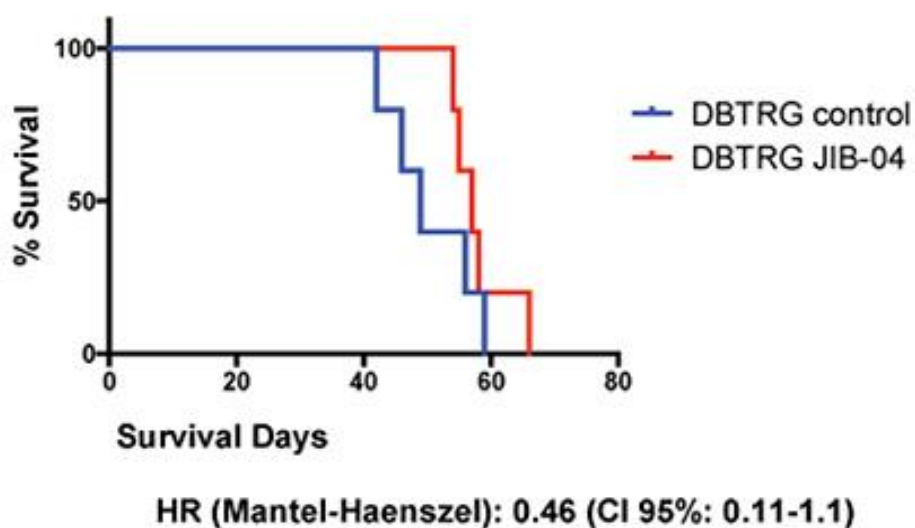


Figura 20: Curve di Kaplan-Maier di 10 topi NOD-SCID xenotrapiantati ortotopicamente con cellule DBTRG trattate con JIB 04 60mg/Kg (N: 5) o con placebo (N: 5) tre volte a settimana per tre settimane di trattamento. Il rapporto di rischio (HR) dei topi trattati con JIB 04 è circa 0,5.

Discussione

Nonostante i molti studi clinici e sperimentali effettuati con farmaci di nuova concezione, ad oggi nella sopravvivenza dei pazienti con glioblastoma non si è registrato alcun miglioramento sostanziale rispetto all'introduzione del chemioterapico TMZ, un agente alchilante introdotto nella pratica clinica del GBM nel 2005. Il TMZ stesso d'altro canto, che ha migliorato i tassi di sopravvivenza dei pazienti in modo statisticamente significativo, in termini assoluti aumenta la sopravvivenza solo di pochi mesi.

Un problema importante cui i pazienti in terapia vanno quasi invariabilmente incontro inoltre è il fenomeno di chemioresistenza che rende, di fatto, non più efficace l'unico chemioterapico disponibile.

Nonostante molte molecole antitumorali risultino fortemente attive *in vitro* contro le cellule di GBM, spesso gli studi relativi non superano la fase pre-clinica perché nel GBM esiste la necessità di superare la Barriera ematoencefalica (BBB) che limita fortemente la diffusione della molecole terapeutiche nel sito del tumore impedendo la diffusione di concentrazioni clinicamente rilevanti di questi farmaci.

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di porre le basi per una strategia sperimentale contro il GBM identificando molecole che risultassero biodisponibili nella sede intracranica e che permettessero di superare la chemioresistenza al TMZ così che nel contesto di una terapia adiuvante l'intervallo libero da malattia prima di una eventuale ripresa di malattia risultasse aumentato.

E' stato ipotizzato che il chemioterapico TMZ, anche se efficace contro la maggior parte della massa tumorale, non riesca ad eliminare una quota residua di cellule che si trovano in una condizione di bassa proliferazione e che sopravvivono al trattamento avendo acquisito una transitoria resistenza al TMZ riprendendo poi a proliferare.

Per poter studiare queste cellule abbiamo sviluppato un modello di resistenza ai farmaci *in vitro* che ci consentisse di isolare ed espandere queste cellule. Dopo un trattamento acuto con TMZ abbiamo dimostrato che le cellule di linee continue e le colture primarie rispondono sviluppando una resistenza transitoria e reversibile attraverso un meccanismo che abbiamo definito come "resilienza epigenetica" per descrivere la plasticità che hanno le cellule tumorali di modificarsi e rispondere allo stimolo acuto e alla sua sospensione.

Nel glioblastoma, diversi geni appartenenti alla famiglia delle istone demetilasi (KDM) sono sovraespressi rispetto alle cellule cerebrali normali e la loro espressione è transitoriamente aumentata durante l'acquisizione della resistenza al TMZ.

KDM5A è un driver della resistenza comune a vari tipi di tumore^{41 42 43} e nel GBM in particolare ha un ruolo centrale nella resistenza al Temozolomide in quanto la sua sovraespressione o il suo silenziamento mimano rispettivamente la resistenza o la sensibilità al TMZ⁴⁴. Anche KDM1⁴⁵, e più recentemente KDM6A e KDM6B⁴⁶ sembra ricoprano un ruolo nel glioblastoma. KDM1, KDM4A, KDM5A e KDM5B risultano transientemente sovraespressi nelle cellule di GBM che hanno acquisito resistenza al TMZ, KDM4B è up-regolato in risposta alla radioterapia^{47 48} e KDM6B è stato identificato come possibile bersaglio terapeutico nel glioma pontino diffuso (DPIG), una forma pediatrica di glioma (DIPG)⁴⁹.

Vista la generale overespressione delle KDM legata alla chemioresistenza nel glioblastoma e in altri tipi di tumore, sono stati individuati o sviluppati inibitori multi-target o specifici contro alcune KDM; alcuni tra questi inibitori sono stati studiati nel corso di questo progetto di studio.

Abbiamo dimostrato che l'inibizione di membri della famiglia KDM può interferire con la crescita delle cellule tumorali *in vitro* e *in vivo*. Dopo aver identificato KDM5A come una tra le principali demetilasi istoniche coinvolte nella resistenza al TMZ nel GBM, abbiamo utilizzato JIB 04, un inibitore multiplo delle KDM con attività massima contro KDM5A^{50 51},

CPI 455, un inibitore selettivo della famiglia KDM5⁵² e GSK J4⁵³, un inibitore specifico per KDM6B.

JIB 04 in particolare è una molecola di piccole dimensioni che inibisce l'attività della famiglia Jumonji di KDM⁵⁴ e, quando viene testata su proteine purificate, esercita la sua massima attività inibitoria contro KDM5A (IC50: 230 nM) e ha come target secondari KDM4D / 4B / 4A / 6B / 4C.

I risultati hanno dimostrato che queste molecole possono inibire efficientemente la crescita cellulare in cellule di GBM native e resistenti alla TMZ. JIB 04 è sensibilmente più efficace di CPI 455⁵⁵ e GSK J4 nell'attività antineoplastica ed è stato utilizzato ed analizzato più approfonditamente nello studio.

Abbiamo dimostrato che JIB 04 demetila la Lisina 4 dell'istone H3 e attiva l'espressione di geni soppressori di tumori. Il breve trattamento (60 minuti) di cellule di GB con JIB 04 è sufficiente ad inattivare il pathway PI3K /AKT, uno dei meccanismi di sopravvivenza centrale delle cellule tumorali. Questi stessi trattamenti sono sufficienti ad attivare i meccanismi apoptotici della cellula e a ridurne drasticamente o abolirne le proprietà clonogeniche. La maggiore efficacia di JIB 04 rispetto agli altri inibitori analizzati potrebbe essere dovuta ad un'attività inibitoria di JIB 04 rivolta a più KDM coinvolte nella proliferazione cellulare e nella resistenza ai farmaci.

Dal momento che il TMZ, pur con i suoi limiti, rappresenta lo standard terapeutico nel GBM, abbiamo valutato l'effetto di TMZ e JIB 04 combinati e abbiamo dimostrato un possibile effetto sinergico delle due molecole. La sinergia è stata raggiunta con un particolare schema di trattamento che prevede il TMZ utilizzato per la durata di un ciclo di chemioterapia di 60 ore con l'aggiunta del JIB 04 nelle ultime 12 ore del trattamento con TMZ. Il razionale di questo risultato può essere spiegato con l'effetto delle due molecole sul ciclo cellulare che ci ha portato a formulare un'ipotesi (Figura 21) circa la modalità con cui il glioblastoma diviene resistente al TMZ. Secondo questa ipotesi di lavoro il JIB 04 si configura come un

potenziale nuovo farmaco, che, in combinazione con TMZ, colpisce un differente tipo di cellule non più rispondente al TMZ stesso: nel GBM il TMZ, che blocca il ciclo cellulare in fase G2, eliminerebbe molte delle cellule tumorali; una piccola percentuale di cellule residue potrebbe superare il blocco in G2 in seguito all'acquisizione della resistenza al TMZ e, riacquisendo la capacità di proliferare, potrebbe contribuire alla ripresa di malattia. JIB 04 bloccando in fase G1 queste cellule residue resistenti al TMZ quindi potrebbe eradicare questo secondo tipo meno numeroso ma più aggressivo di cellule.

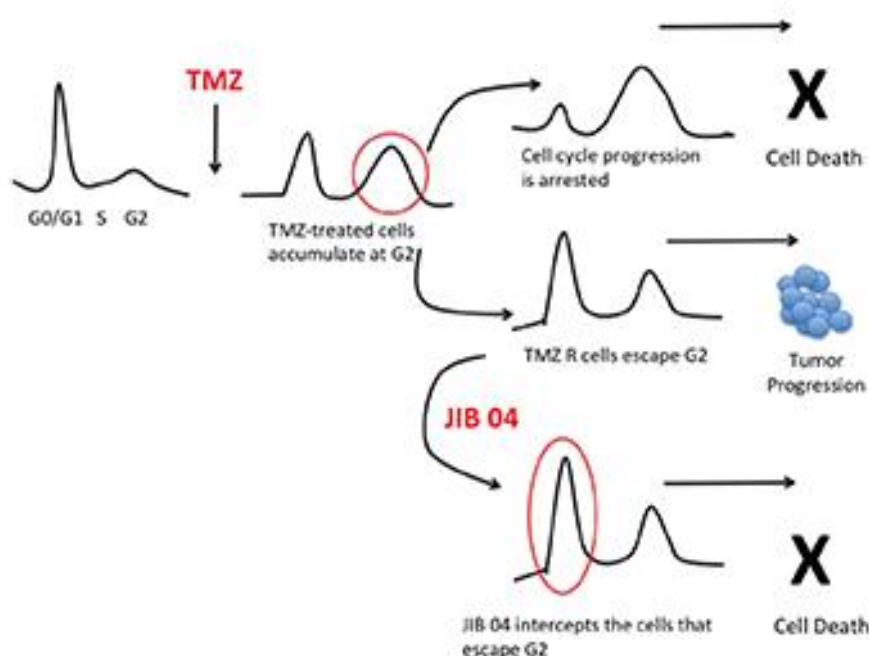


Figura 21: Elaborazione di una ipotesi di lavoro a spiegazione dell'effetto sinergico di TMZ con JIB 04 che mira ad eliminare le cellule tumorali TMZ R responsabili della ripresa di malattia nel GBM

JIB 04 diminuisce il tasso di crescita in linee cellulari continue del cancro alla mammella e ai polmoni e prolunga la sopravvivenza dei topi con xenotrapianti di tumore sottocutaneo ⁵⁶.

Come tale, JIB 04 appare come un potenziale candidato per terapie sperimentali nel GBM.

I dati sperimentali che abbiamo ottenuto indicano che *in vivo*, in un modello murino, la

molecola JIB 04 è rapidamente metabolizzata e riesce efficacemente a superare la barriera ematoencefalica mantenendo concentrazioni efficaci per ottenere un effetto antitumorale con una buona tollerabilità da parte dell'animale. Questo risultato era necessariamente preliminare a successivi studi *in vivo* su un modello ortotopico murino NOD-SCID in cui i topi hanno subito uno xenotrapianto con cellule di GBM DBTRG in sede cerebrale.

In questo studio pilota il trattamento con la molecola JIB 04 ha dimostrato un effetto antitumorale raddoppiando la sopravvivenza del gruppo trattato rispetto a quello sottoposto a placebo confermando l'effetto antitumorale anche *in vivo*. Ulteriori studi saranno necessari per confermare *in vivo* se la combinazione TMZ - JIB 04 potrebbe replicare i risultati già osservati *in vitro*.

Nel loro complesso i dati prodotti indicano che è possibile superare la chemioresistenza al TMZ nei gliomi attraverso l'inibizione di istone-demetilasi, enzimi che con la loro alterata overespressione tendono a modificare epigeneticamente le cellule di GBM rendendole resistenti al trattamento.

Vista la centralità che le KDM stanno assumendo nei meccanismi di chemioresistenza, non solo nel GBM ma anche in altri tipi di tumore e dal momento che i meccanismi di chemioresistenza identificati sembrano simili indipendentemente dal contesto tumorale è possibile che questi studi e gli inibitori della KDM possano in futuro contribuire a nuovi protocolli terapeutici nei trattamenti oncologici.

L'utilizzo di queste molecole potrebbe fornire le basi per terapie combinate nelle quali al chemioterapico standard vengano affiancate anche molecole con attività epigenetica.

Plasmando l'epigenoma con queste nuove molecole, le terapie convenzionali potrebbero risultare più efficaci consentendo ai pazienti di avere con meno probabilità una ripresa di malattia o almeno un più lungo periodo libero da malattia risultante in una maggiore sopravvivenza e qualità di vita.

Bibliografia

- ¹ Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109
- ² Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol* 2013;15 Suppl 2:ii1–ii56
- ³ Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 2012;107:207–12.
- ⁴ Tran B, Rosenthal MA. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J Clin Neurosci* 2010;17: 417–21
- ⁵ Kleihues P et al (2000). Glioblastoma. In Kleihues P, Cavenee WK, eds (2000). *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*, World Health Organization classification of tumours. Lyon, France: IARC Press, ISBN 92-832-2409-4
- ⁶ Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* 2000;28:164–70
- ⁷ Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892–9.
- ⁸ Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009;100:2235–41.
- ⁹ Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445–53

-
- ¹⁰ Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol* 2013;15 Suppl 2:ii1–ii56
- ¹¹ Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>
- ¹² Hodges LC, Smith JL, Garrett A, Tate S. Prevalence of glioblastoma multiforme in subjects with prior therapeutic radiation. *J Neurosci Nurs* 1992;24:79–83.
- ¹³ Schwartzbaum JA, Xiao Y, Liu Y, Tsavachidis S, Berger MS, Bondy ML, et al. Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis* 2010;31:1770–7
- ¹⁴ Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of Glioblastoma multiforme. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2:494–503.
- ¹⁵ Amirian, E Susan et al. “Antihistamine use and immunoglobulin E levels in glioma risk and prognosis” *Cancer epidemiology* vol. 37,6 (2013): 908-12.
- ¹⁶ Hoschberg F, Toniolo P, Cole P, Scalman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neuroincol*. 1999;8:55–60.
- ¹⁷ Al-Serori H, Ferk F, Kundi M, Bileck A, Gerner C, Mišák M, Nersesyan A, Waldherr M, Murbach M, Lah TT, Herold-Mende C, Collins AR, Knasmüller S. Mobile phone specific electromagnetic fields induce transient DNA damage and nucleotide excision repair in serum-deprived human glioblastoma cells.. *PLoS One*. 2018 Apr 12;13(4):e0193677. doi: 10.1371/journal.pone.0193677

-
- ¹⁸ Mortazavi SMJ, Mortazavi SAR, Paknahad M. Evaluation of the potential of mobile phone specific electromagnetic fields (UMTS) to produce micronuclei in human glioblastoma cell lines. *Toxicol In Vitro*. 2017 Oct;44:414-415. doi: 10.1016/j.tiv.2017.07.029. Epub 2017 Aug 1
- ¹⁹ Yang M1, Guo W2, Yang C3, Tang J4, Huang Q2, Feng S1, Jiang A1, Xu X1, Jiang G4. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017 May 4;12(5):e0175136. doi: 10.1371/journal.pone.0175136. eCollection 2017..
- ²⁰ Wang Y, Guo X. Meta-analysis of association between mobile phone use and glioma risk. *J Cancer Res Ther*. 2016 Dec;12(Supplement):C298-C300. doi: 10.4103/0973-1482.200759.
- ²¹ Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2002; 80():1-395.
- ²² Turner MC, Benke G, Bowman JD, et al. Occupational exposure to extremely low-frequency magnetic fields and brain tumor risks in the INTEROCC study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(9):1863-72.
- ²³ Ostrom, Quinn T et al. "The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review" *Neuro-oncology* vol. 16,7 (2014): 896-913.
- ²⁴ Rycak K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol*. 2014 Aug;90(8):615-21. doi: 10.3109/09553002.2014.892227. Epub 2014 Mar 7.
- ²⁵ Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96
- ²⁶ . Hirose Y, Kreklau EL, Erickson LC, Berger MS, Pieper RO. Delayed repletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase resulting in failure to protect the human

glioblastoma cell line SF767 from temozolomide-induced cytotoxicity. *J Neurosurg.* 2003 Mar;98(3):591-8.

²⁷ Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. . MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* (2005) 352:997–1003. 10.1056/NEJMoa043331

²⁸ Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):69-80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027.

²⁹ Banelli B, Carra E, Barbieri F, Würth R, Parodi F, Pattarozzi A, Carosio R, Forlani A, Allemanni G, Marubbi D, Florio T, Daga A, Romani M. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle.* 2015;14(21):3418-29. doi: 10.1080/15384101.2015.1090063.

³⁰ Banelli B, Carra E, Barbieri F, Würth R, Parodi F, Pattarozzi A, Carosio R, Forlani A, Allemanni G, Marubbi D, Florio T, Daga A, Romani M. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma.. *Cell Cycle.* 2015;14(21):3418-29. doi: 10.1080/15384101.2015.1090063.

³¹ www.airc.it/cancro/prevenzione-tumore/prevenzione-per-tutti/cancro-la-prevenzione

³² Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 2009; 27:40-8; PMID:18948646; <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2008-0493>

-
- ³³ Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, Ruiz J, Bruick R, Pena-Llopis S, Xu J, Babinski DJ, Frantz DE, Brekken RA, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun.* 2013; 4:2035.
- ³⁴ Donatella Vecchio, Antonio Daga, Elisa Carra, Daniela Marubbi, Gabriella Baio, Carlo E. Neumaier, Stefano Vagge, Renzo Corvò, Maria Pia Brisigotti, Jean Louis Ravetti, et al. Predictability, efficacy and safety of radiosensitization of glioblastoma-initiating cells by the ATM inhibitor KU-60019.. *Int J Cancer.* 2014 Jul 15; 135(2): 479–491. Published online 2014 Jan 8. doi: 10.1002/ijc.28680
- ³⁵ Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, Ruiz J, Bruick R, Pena-Llopis S, Xu J, Babinski DJ, Frantz DE, Brekken RA, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun.* 2013; 4:2035.
- ³⁶ Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, Arora S, Tindell CA, Wilson C, Williamson KE, Guler GD, Gangurde P, Manieri W, Busby J, Flynn EM, Lan F, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nature chemical biology.* 2016; 12:531–538.
- ³⁷ Stepp MW, Folz RJ, Yu J, Zelko IN. The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy. *Biochimica et biophysica acta.* 2014; 1843:1076–1088.
- ³⁸ Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, et al. Identification of a novel hypoxia- inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:2283–2293.

-
- ³⁹ Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J*. 2016; 30:3961–3978.
- ⁴⁰ Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010; 70:440–446.
- ⁴¹ Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010; 141:69–80.
- ⁴² Yan H, Chen X, Zhang Q, Qin J, Li H, Liu C, Calhoun- Davis T, Coletta LD, Klostergaard J, Fokt I, Skora S, Priebe W, Bi Y, et al. Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: depletion of CD44 cells and evidence for epigenetic mechanisms. *PLoS One*. 2011; 6:e24397.
- ⁴³ Hou J, Wu J, Dombkowski A, Zhang K, Holowatyj A, Boerner JL, Yang ZQ. Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. *Am J Transl Res*. 2012; 4:247–256.
- ⁴⁴ Banelli B, Daga A, Forlani A, Allemanni G, Marubbi D, Pistillo MP, Profumo A, Romani M. Small molecules targeting histone demethylase genes (KDMs) inhibit growth of temozolomide-resistant glioblastoma cells.. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):34896-34910. doi: 10.18632/oncotarget.16820.
- ⁴⁵ Sareddy GR, Nair BC, Krishnan SK, Gonugunta VK, Zhang QG, Suzuki T, Miyata N, Brenner AJ, Brann DW, Vadlamudi RK. KDM1 is a novel therapeutic target for the treatment of gliomas. *Oncotarget*. 2013; 4:18–28.
- ⁴⁶ Liao BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, Venteicher AS, Hebert CH, Carey CD, Rodig SJ, Shareef SJ, Najm FJ, van Galen P, et al. Adaptive

Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell*. 2017; 20:233–246.e7.

⁴⁷ Biddlestone-Thorpe L, Sajjad M, Rosenberg E, Beckta JM, Valerie NC, Tokarz M, Adams BR, Wagner AF, Khalil A, Gilfor D, Golding SE, Deb S, Temesi DG, et al. ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:3189–3200.

⁴⁸ Shi W, Palmer JD, Werner-Wasik M, Andrews DW, Evans JJ, Glass J, Kim L, Bar-Ad V, Judy K, Farrell C, Simone N, Liu H, Dicker AP, et al. Phase I trial of panobinostat and fractionated stereotactic re-irradiation therapy for recurrent high grade gliomas. *J Neurooncol*. 2016;127:535–539.

⁴⁹ Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA, Quist MJ, Davis LE, Huang EC, Woo PJ, Ponnuswami A, Chen S, Johung TB, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature medicine*. 2015; 21:555–559.

⁵⁰ Hou J, Wu J, Dombkowski A, Zhang K, Holowatyj A, Boerner JL, Yang ZQ. Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. *Am J Transl Res*. 2012; 4:247–256.

⁵¹ Yan H, Chen X, Zhang Q, Qin J, Li H, Liu C, Calhoun- Davis T, Coletta LD, Klostergaard J, Fokt I, Skora S, Priebe W, Bi Y, et al. Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: depletion of CD44 cells and evidence for epigenetic mechanisms. *PLoS One*. 2011; 6:e24397.

⁵² Banelli B, Daga A, Forlani A, Allemanni G, Marubbi D, Pistillo MP, Profumo A, Romani M. Small molecules targeting histone demethylase genes (KDMs) inhibit growth of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):34896-34910. doi: 10.18632/oncotarget.16820.

-
- ⁵³ Sui A, Xu Y, Li Y, Hu Q, Wang Z, Zhang H, Yang J, Guo X, Zhao W. The pharmacological role of histone demethylase JMJD3 inhibitor GSK-J4 on glioma cells. *Oncotarget*. 2017 Aug 2;8(40):68591-68598. doi: 10.18632/oncotarget.19793. eCollection 2017 Sep 15.
- ⁵⁴ Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, Ruiz J, Bruick R, Pena-Llopis S, Xu J, Babinski DJ, Frantz DE, Brekken RA, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun*. 2013; 4:2035.
- ⁵⁵ Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, Arora S, Tindell CA, Wilson C, Williamson KE, Guler GD, Gangurde P, Manieri W, Busby J, Flynn EM, Lan F, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nature chemical biology*. 2016; 12:531–538.
- ⁵⁶ Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, Ruiz J, Bruick R, Pena-Llopis S, Xu J, Babinski DJ, Frantz DE, Brekken RA, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun*. 2013; 4:2035.

Ringraziamenti

Sono molte le persone che hanno contribuito a questo progetto nei fatti, con una discussione costruttiva, talvolta anche contribuendo con un diverso punto di vista.

Vorrei ringraziare il Professore Alberto Izzotti perché in questo percorso si è dimostrato una volta di più una presenza concreta, collaborativa e mai limitante. Senza di lui non avrei mai potuto continuare a fare ricerca sugli argomenti che amo.

Un ringraziamento va al Dott. Massimo Romani con cui ho sviluppato molti progetti di epigenetica e che mi ha fatto amare e rispettare il “fare ricerca”.

Grazie alla Dott.sa Maria Pia Pistillo che mi ha consentito di applicare quello che ho imparato in campi anche più vasti e complessi.

Grazie a tutti gli amici dei laboratori con cui ho collaborato e che mi hanno “supportato” e “sopportato”.

Grazie infine alla mia famiglia che non ha mai mancato di appoggiarmi.